

RECHERCHE ET DOSAGE DE QUELQUES ANTISEPTIQUES DANS LES SEMI-CONSERVES DE POISSON

par Jean FOUGERAS LAVERGNOLLE (1)

Les semi-conserves sont, par définition, des produits de conservation limitée parce qu'elles ne sont pas stériles (2). Traitées tantôt par le sel, tantôt par le vinaigre, tantôt par la fumée, tantôt par l'huile ou par plusieurs de ces agents successivement, puis enfermées dans un emballage étanche aux liquides, elles se gardent mieux qu'un produit frais, sans atteindre toutefois une durée comparable à celle des produits appertisés.

Leur consommation tend à croître, car prêtes à être consommées et flattant le goût, elles sont fréquemment l'agrément d'un repas à la préparation duquel la maîtresse de maison a de moins en moins de temps à consacrer. Leur diffusion dans le public est facilitée par le développement de l'équipement frigorifique, aussi bien dans le commerce que chez les particuliers.

Malgré cela, il serait agréable pour le fabricant, les commerçants et les consommateurs d'accroître la durée de conservation de ces produits. Étant donné que la plupart d'entre eux perdraient leurs qualités gustatives à la stérilisation, on a souvent tenté de ralentir leur dégradation en y ajoutant des antiseptiques. Malheureusement, l'ingestion habituelle d'antiseptiques n'est pas sans danger pour le consommateur, et les hygiénistes français s'efforcent d'en limiter l'usage.

La réglementation française actuelle est extrêmement restrictive à ce sujet, alors que celle de nombreux pays étrangers est beaucoup plus libérale. De nombreuses études sont en cours devant les différentes instances internationales en vue d'harmoniser la législation, après avoir défini avec plus de précision les risques que l'emploi de ces produits présente pour l'hygiène alimentaire.

Quoi qu'il advienne, il importe de disposer de méthodes précises pour doser les additions éventuelles d'antiseptiques, afin de s'assurer que les teneurs maximales autorisées n'ont pas été dépassées.

Le présent travail a été entrepris en vue de mettre au point une méthode pratique de détection et de dosage des antiseptiques dérivés de l'acide benzoïque et de quelques autres qui sont employés assez fréquemment dans les semi-conserves de poissons de certains pays étrangers. La technique comprend une extraction des antiseptiques à partir de la semi-conserve homogénéisée, une purification de l'extrait, une recherche qualitative des antiseptiques par chromatographie sur couche mince, un dosage par spectrophotographie dans l'UV ou par chromatographie en phase gazeuse suivant le cas.

Les antiseptiques recherchés sont : l'acide benzoïque, l'acide salicylique, l'acide p-hydroxybenzoïque, l'ester méthylique de l'acide p-hydroxybenzoïque, l'acide p-chloro-benzoïque, l'acide sorbique, l'acide déhydroacétique, l'acide o-amino-benzoïque (fig. 1).

(1) Avec la collaboration technique de M. DIAZ GARCIA, pharmacien, durant son stage en 1967-1968 à l'Institut.

(2) La définition des semi-conserves selon le décret du 10 février 1955 est la suivante : « sont considérées comme semi-conserves au sens du présent décret, les denrées alimentaires d'origine végétale ou animale, périssables, conditionnées en récipients étanches aux liquides, et ayant subi, en vue d'assurer une conservation plus limitée, un traitement autorisé par arrêté pris dans les conditions susvisées ».

Extraction.

Les antiseptiques en cause peuvent être extraits de la semi-conserve soit par solvant, soit par entraînement à la vapeur d'eau.

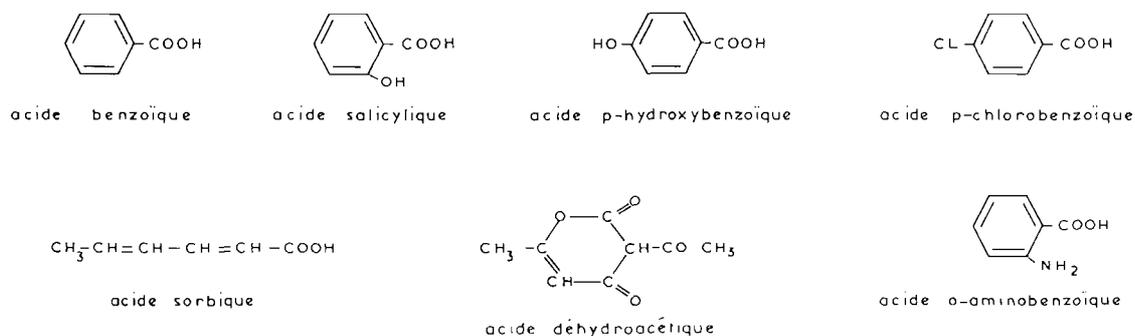
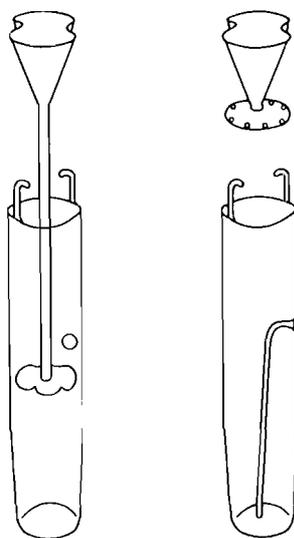


FIG. 1. — Formule des antiseptiques recherchés.

a) Extraction par solvant.

Bien que s'appliquant assez mal aux produits solides qui sont les plus nombreux parmi les semi-conserves de poissons, elle a été essayée avec l'éther sulfurique, le chloroforme et le cyclohexane, en utilisant les extracteurs BBS. Suivant que le solvant est plus léger ou plus lourd que la phase aqueuse à extraire, l'appareil employé est du modèle LE ou LO (fig. 2).



type LE. type LO

FIG. 2. — Cartouches de l'extracteur BBS.

laboratoire d'un appareil d'entraînement⁽¹⁾. Elle est acidifiée par l'acide citrique à raison de 5 ml d'une solution à 60 %.

Les extractions ont été conduites sur 0,5 mg ou 10 mg d'antiseptiques en solution dans 5 ml acidifiée par 2 ml d'acide sulfurique 10 N ou 1 ml d'acide chlorhydrique concentré ; elles ont été poursuivies pendant 2 h à l'ébullition.

Les rendements sont le plus souvent médiocres (tabl. 1). Les meilleurs sont obtenus avec l'éther sulfurique en milieu chlorhydrique ; bien que n'ayant pas une portée générale, cette technique présente un intérêt pour l'acide p-hydroxybenzoïque et son ester méthylique qui sont très peu entraînés à la vapeur d'eau.

b) Entraînement à la vapeur.

L'entraînement à la vapeur d'eau a l'avantage de s'appliquer indifféremment quel que soit l'état physique de la semi-conserve, et d'être plus sélectif que l'extraction par solvant mais son rendement est parfois si faible qu'il faut recueillir un volume considérable de distillat pour obtenir un taux d'extraction convenable. Ceci prolonge exagérément l'opération et gêne la récupération du produit recherché.

Nous avons déterminé le rendement de l'entraînement pour deux doses de chacun des antiseptiques en cause : 0,5 mg et 10 mg, en recueillant 250, 300, 400 ou 500 ml de condensat. L'antiseptique est dissous dans 20 ml d'une saumure à 5 % NaCl, afin de se placer dans un milieu comparable aux semi-conserves qui sont presque toujours fortement salées. La prise d'essai est placée dans le ballon

(1) Appareil de DIEMAIR et POSTEL, communication personnelle.

Le distillat est recueilli sur 1 à 2 ml d'eau de chaux de manière à éviter toute perte d'acide volatil. Il est ensuite exactement neutralisé à l'eau de chaux, puis purifié au moyen de 80 ml d'éther, afin d'extraire les substances volatiles telles qu'amines et aldéhydes qui perturberaient les déterminations ultérieures.

La phase aqueuse est alors évaporée à sec. Nous avons vérifié sur des solutions standard que cette opération n'entraîne pas de pertes sensibles si le milieu est exactement neutralisé, tandis qu'une bonne partie de l'acide sorbique serait détruite en milieu alcalin. Le résidu sec

Antiseptiques	Ether sulfurique		Chloroforme	Cyclohexane
	H ₂ SO ₄ 10 N 2 ml	HCl conc. 1 ml	HCl conc. 1 ml	HCl conc. 1 ml
<i>Acide benzoïque</i> 0,5 mg 10 mg	43 % 64 %	100 % 85 %	35 % 43 %	— 32 %
<i>Acide salicylique</i> 0,5 mg 10 mg	36 % 35 %	35 % 36 %	30 % 15 %	— 27 %
<i>Acide sorbique</i> 0,5 mg 10 mg	— —	— 71 %	20 % 57 %	— —
<i>Acide déhydroacétique</i> 0,5 mg 10 mg	— 72 %	— 71 %	41 % 66 %	— —
<i>Acide o-aminobenzoïque</i> 0,5 mg 10 mg	— —	88 % 67 %	10 % 0	— —
<i>Acide p-hydroxybenzoïque</i> 0,5 mg 10 mg	— 92 %	— 80 %	11 % 0	— —
<i>Ester méthylique</i> 0,5 mg 10 mg	— —	— 80 %	68 % 80 %	— —

TABLEAU 1. — Rendement de l'extraction par solvant de 7 antiseptiques en solution aqueuse.

dissous dans un volume connu d'alcool chlorhydrique (H Cl N dans l'alcool à 80°) est examiné dans l'ultra-violet. Les acides, dont la présence a été confirmée par voie chromatographique, peuvent être dosés d'après leur spectre.

Dans la suite du travail, l'évaporation à sec s'est avérée longue et gênante en raison des produits entraînés qui ont tendance à caraméliser. Nous lui avons alors substitué une extraction à l'éther en milieu acide. La solution étherée obtenue est évaporée à sec à l'évaporateur rotatif, puis le résidu est repris par l'alcool chlorhydrique.

L'étude des courbes de distillation des divers acides examinés (fig. 3, 4 et 5) montre que dans la plupart des cas, les quantités recueillies augmentent peu à peu en passant de 300 à 500 ml de distillat alors que la durée de l'opération dans nos conditions d'expérience passe de 45 à 90 mn. Aussi avons-nous choisi dans la pratique courante de recueillir seulement 300 ml de distillat. Le taux de récupération est meilleur pour l'acide benzoïque et l'acide salicylique

lorsque la dose d'antiseptique initiale est plus faible ; l'inverse est vrai pour les acides sorbique et déhydroacétique.

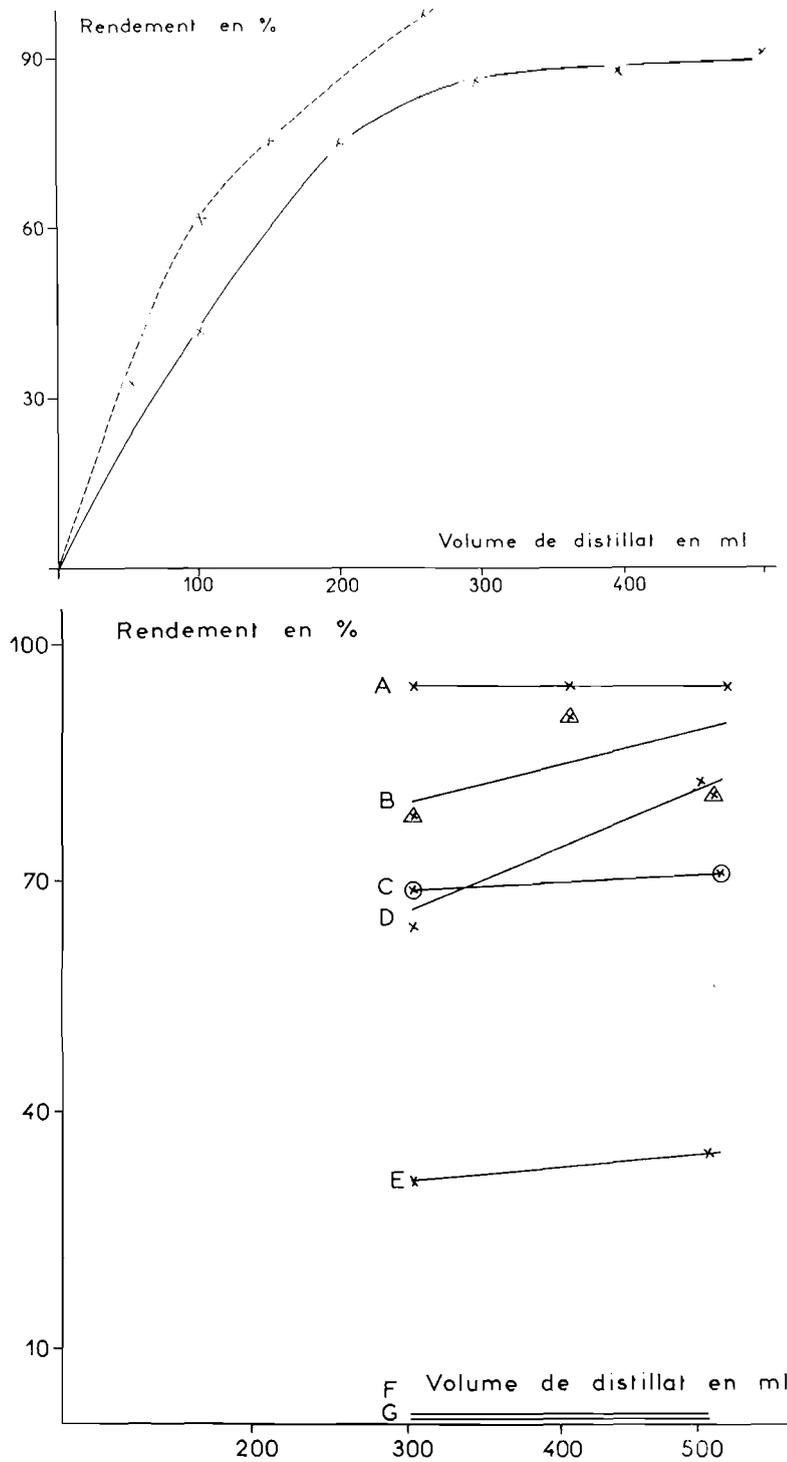


FIG. 3 et 4. — Rendement par entraînement à la vapeur en fonction du volume de distillat, en haut, pour 0,5 mg d'acide benzoïque (tireté) et 10 mg d'acide benzoïque (trait plein) ; en bas, pour 0,5 mg d'antiseptique.

On remarque que le taux de récupération est très bas pour l'acide o-aminobenzoïque et pratiquement nul pour l'acide p-hydroxybenzoïque. Ceux-ci seront donc recherchés par extraction du résidu de distillation à l'éther en milieu chlorhydrique.

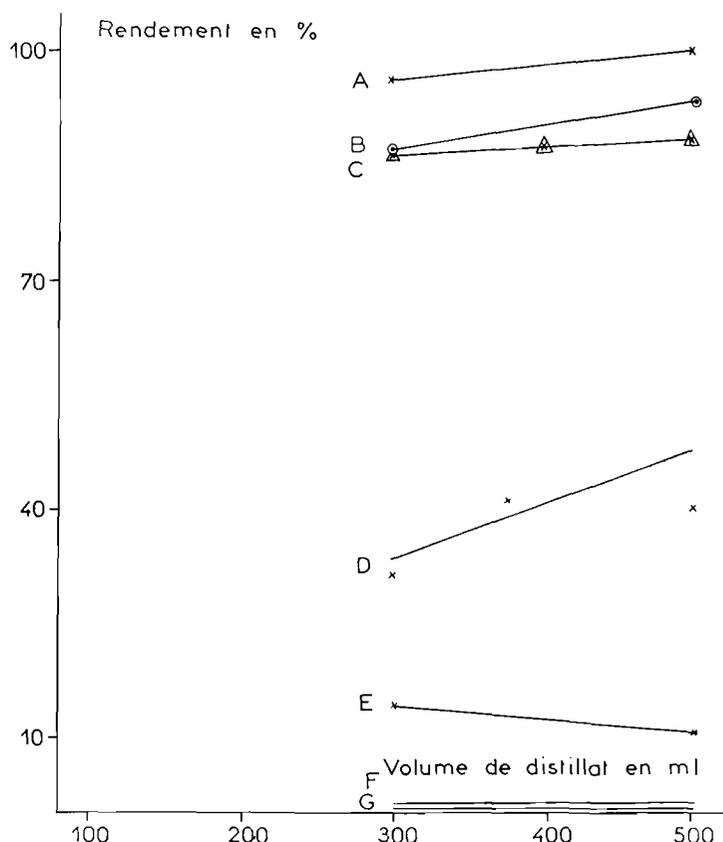


FIG. 5. — Rendement par entraînement à la vapeur en fonction du volume de distillat pour 10 mg d'antiseptique.

Identification par spectre ultra-violet.

Les spectres UV de référence, établis pour des concentrations de 5 ou 10 microgrammes par ml pour chacun des acides considérés, montrent que plusieurs d'entre eux ont des pics d'ampleur comparable dans la même région du spectre, de sorte qu'il serait impossible de les distinguer s'ils étaient additionnés simultanément au même produit (fig. 6). Le cas est fort heureusement assez rare. La détermination du spectre ultra-violet permet donc d'avoir une indication sur la nature de l'antiseptique ajouté et, le cas échéant, de le doser en tenant compte du coefficient d'extinction molaire (tabl. 2) et du rendement de l'extraction.

Il est néanmoins indispensable de recouper cette première indication par une détermination au moyen d'une autre technique.

Recherche qualitative par chromatographie en couche mince.

La détermination qualitative des acides recherchés peut être faite commodément par chromatographie sur couche mince de silice de l'extrait alcoolique obtenu après entraînement à la vapeur d'eau.

Les plaques (20 × 20 mm) sont préparées par étalement d'une bouillie contenant 60 g de silice Kieselgel G dans 120 ml d'eau distillée. Elles sont activées par un séchage de 30 mn à

105°C. Après dépôt de la substance à déterminer et des substances de référence sur la ligne de

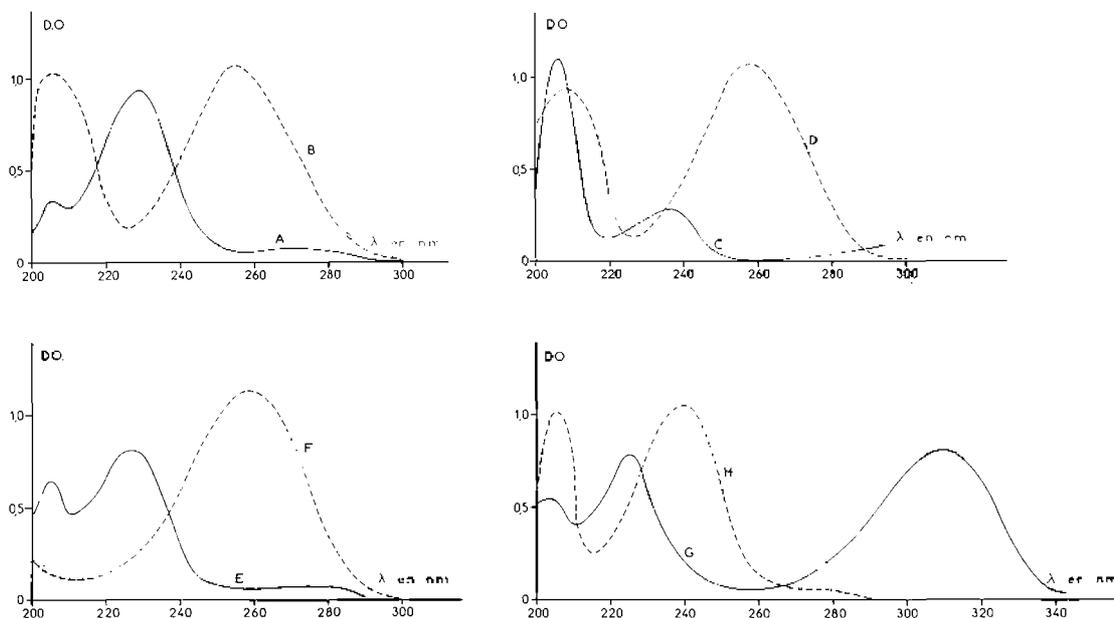


FIG. 6. — Spectres d'absorption dans l'ultra-violet : A) acide benzoïque 10 μ g/ml. B) acide hydroxybenzoïque 10 μ g/ml (en haut, à gauche) ; C) acide salicylique 5 μ g/ml. D) acide p-hydroxybenzoate de méthyle 10 μ g/ml (à droite) ; E) acide o-aminobenzoïque 10 μ g/ml, F) acide sorbique 5 μ g/ml (en bas, à gauche) ; G) acide déhydroacétique 10 μ g/ml, H) acide p-chlorobenzoïque 10 μ g/ml (à droite).

Antiseptiques	λ max. nm	Concentr. μ /g/ml	D.O.	Σ Coef. extinction molaire
Acide benzoïque	229-230	10	0,93	11.400
Acide salicylique	206-237	5	1,10	30.380
Acide p-chlorobenzoïque	205-240	10	1,05	16.439
Acide sorbique	260	5	1,15	27.580
Acide p-hydroxybenzoïque	206-255	10	1,08	14.916
Ester méthylique de l'acide p-hydroxybenzoïque	210-260	10	1,06	16.126
Acide o-aminobenzoïque	225-230	10	0,80	10.970
Acide déhydroacétique	225-310	10	0,82	13.788

TABLE 2. — Caractéristiques du spectre de 8 antiseptiques dans l'ultra-violet.

départ, les plaques sont placées dans une cuve verticale garnie à la base d'un solvant approprié.

Deux types de solvant ont été utilisés concurremment, l'un acide mis au point par GOSSELE : éther de pétrole 10 ml, chloroforme 4 ml, acide formique 1 ml ; l'autre basique proposé par MITCHELL : acétone 90 ml, eau 7 ml, ammoniacque 22°B 3 ml. L'éluant acide permet une

meilleure identification de l'acide benzoïque, tandis que l'éluant basique sépare mieux l'acide p-hydroxybenzoïque et son ester méthylique.

Antiseptiques	Eluant acide		Eluant basique	
	coloration	R.F.	coloration	R.F.
A. — Révélateur ferroso-ferrique				
Acide o-aminobenzoïque	rouge brun	0,01	rouge brun	0,46
Acide p-hydroxybenzoïque	vert foncé	0,03	vert	0,23
p-hydroxybenzoate de méthylé	vert clair	0,06	gris vert	0,93
Acide salicylique	violet	0,28	violet	0,70
Acide déhydroacétique	jaune	0,36	jaune	0,73
Acide benzoïque	marron clair	0,40	marron	0,40
Acide p-chlorobenzoïque	marron	0,40	—	—
B. — Révélateur thiobarbiturique				
Acide sorbique	rouge	0,20	rouge	0,18

TABLE 3. — Caractéristiques des migrations en chromatographie sur couche mince de silice.

Après 45 mn environ, le front solvant avoisine le haut des plaques. La « plaque basique » est exposée pendant une vingtaine de minutes aux vapeurs de l'éluant acide, afin de la neutraliser et d'éviter un jaunissement du fond pendant le séchage. Puis, les deux plaques sont séchées à l'air pendant une nuit.

L'examen en lumière UV fait apparaître les acides salicylique et o-aminobenzoïque qui sont doués de fluorescence. Les deux plaques sont alors traitées par une solution diluée d'eau oxygénée et une solution ferroso-ferrique qui sont vaporisées successivement sans séchage intermédiaire. Les différents acides, à l'exception de l'acide sorbique, apparaissent sous forme de taches caractéristiques à la fois par leur emplacement et leur couleur (tabl. 3). L'acide sorbique est révélé sur les mêmes plaques par traitement à l'acide thiobarbiturique en milieu oxydant (bichromate de potassium).

Révélateur ferroso-ferrique.

Solution A. eau oxygénée à 1 % (3,3 ml d'eau oxygénée à 110 volume dans 100 ml H₂O)

Solution B. sulfate ferreux FeSO₄ · 7H₂O, 3 g dans 100 ml H₂O ; chlorure ferrique FeCl₃ · 6H₂O, 3 g dans 100 ml H₂O à mélanger volume à volume juste avant l'emploi.

Révélateur thiobarbiturique.

Solution C. bichromate de potassium K₂Cr₂O₇ 0,01 N.

Solution D. acide thiobarbiturique à employer successivement en laissant 2 à 3 mn à l'étuve (105°C) après chaque vaporisation.

Les spots ressortent plus nettement du fond sur la plaque avec l'éluant acide ; l'acide benzoïque en particulier, apparaît plus rapidement. La coloration jaune de l'acide déhydroacétique est assez fugace. La tache de l'acide p-chlorobenzoïque n'apparaît qu'après 48 h ; son RF est le même que celui de l'acide benzoïque.

Recherche et dosage par chromatographie en phase gazeuse.

Un autre moyen de caractériser les antiseptiques que nous recherchons consiste à les isoler par chromatographie en phase gazeuse, soit directement, soit après estérification.

Les acides sorbique, déhydroacétique et benzoïque peuvent être séparés par injection directe sur colonne DEGS (phase stationnaire – polysuccinate de diéthylène glycol acidifié (fig. 7).

Les acides sorbique, benzoïque, salicylique et o-aminobenzoïque sont séparés sur colonne SE 30 (silicone 30) après méthylation par le diazométhane selon VOGEL (fig. 8).

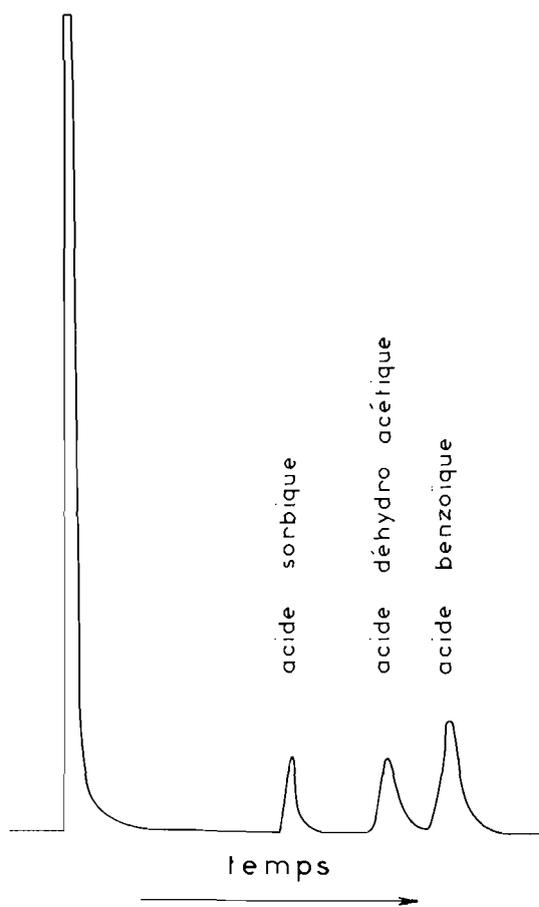


FIG. 7. — Analyse par chromatographie en phase gazeuse de plusieurs antiseptiques. Colonne : 15% DEGS + 3% H₃ PO₄ sur chromosorb P 80/100 mesh. Température 180°C, détection par ionisation de flamme.

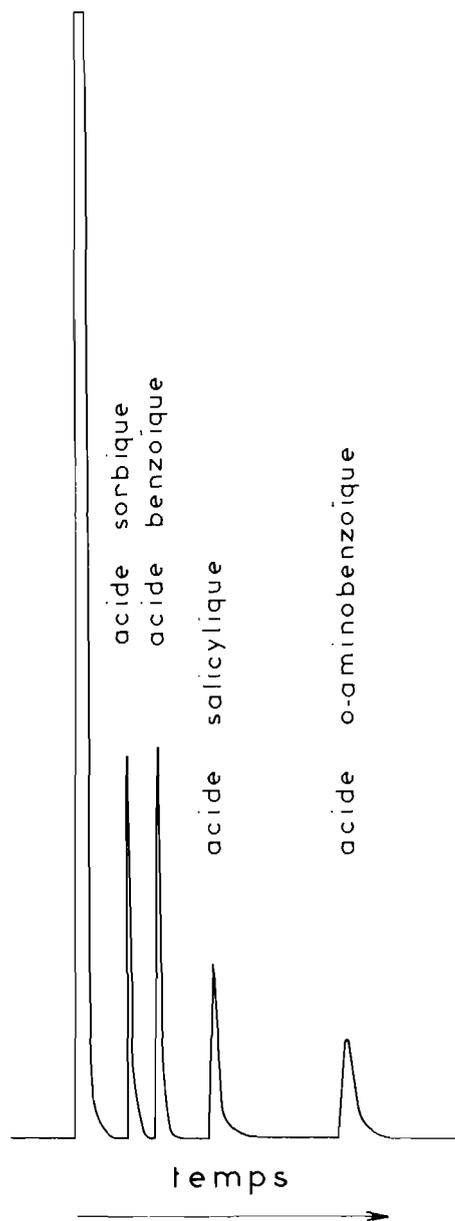


FIG. 8. — Analyse par chromatographie en phase gazeuse de dérivés méthylés d'antiseptiques. Colonne 10% SE 30 sur chromosorb w. AW 80/100 mesh. Température 130°C, détection par ionisation de flamme.

L'acide p-hydroxybenzoïque et son ester méthylique sont séparés sur la même colonne après silylation par le BSA (N.O. bis triométhyl silyl acétamide) dans la pyridine selon KLEBE et coll. (fig. 9).

La méthylation a été faite par le diazométhane $\text{CH}_2 < \begin{matrix} \text{N} \\ | \\ \text{N} \end{matrix}$ de préférence à la réaction

directe avec le méthanol en milieu chlorhydrique dont le rendement est moins bon. A titre indicatif, la méthylation de l'acide benzoïque et de l'acide salicylique est obtenue avec des rendements de 93 et 90 % par le diazométhane contre 34 et 10 % dans le méthanol chlorhydrique. Les conditions de la chromatographie avec ionisation de flamme ont été les suivantes.

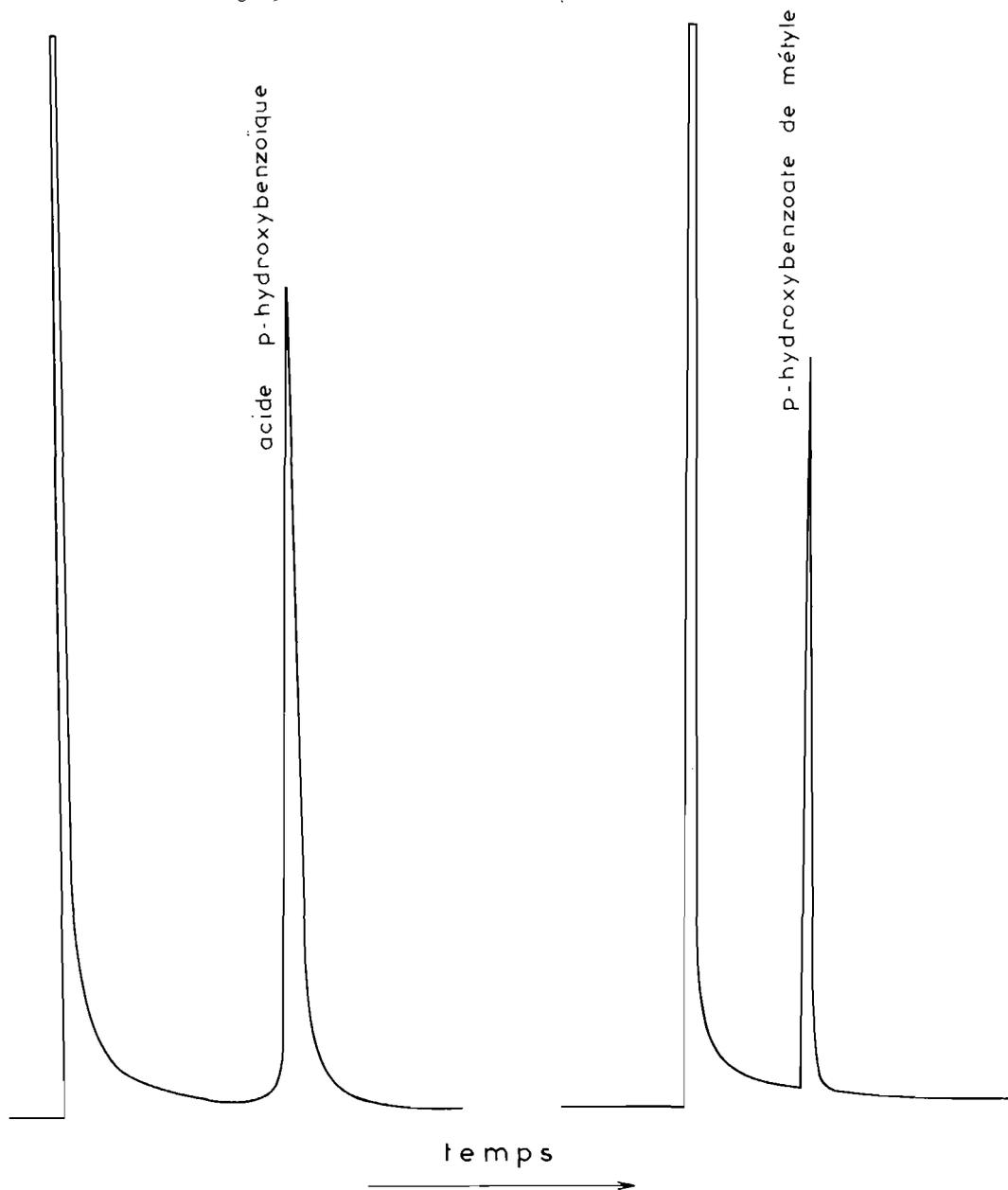


FIG. 9. — Analyse par chromatographie en phase gazeuse de dérivés silylés d'antiseptiques. Colonne 10 % SE 30 sur chromosorb w. AW 80/100 mesh. Température: 150°C, détection par ionisation de flamme.

1°) Colonne DEGS. Colonne acier inox: 5' X 1/8" à 15 % de DEGS, plus 3 % d'acide phosphorique sur chromosorb P 80/100 mesh. Gaz porteur: N₂, débit: 20 ml/mn, températures colonne: 180°C, injecteur: 200°C, isotherme, vitesse de déroulement du papier enregistreur: 5 mm/mn.

2°) Colonne SE 30. Dérivés méthylés : colonne acier inox : 5' X 1/8'' à 10 % de SE 30 sur chromosorb W, AW 80/100 mesh, gaz porteur : N₂, débit : 20 ml/mn, températures colonne : 130°C, injecteur : 160°C, isotherme, vitesse de déroulement du papier enregistreur : 10 mm/mn.

3°) Colonne SE 30. Dérivés silylés : mêmes conditions que ci-dessus, sauf température de colonne : 150°C et vitesse de déroulement du papier enregistreur : 5 mm/mn.

Antiseptiques	Concentr. mg/ml	Quantité injectée en µg	Temps rétention en cm	Hauteur du pic en cm
1°) Colonne DEGS. Injection directe sans transformation préalable.				
Acide sorbique	10	10	4,55	3,70
Acide déhydroacétique	10	10	6,55	8,0
Acide benzoïque	10	10	7,75	8,0
2°) Colonne SE 30. Après transformation en ester méthylique dans une solution éthylique de diazométhane.				
Acide sorbique	5	5	0,96	20,9
Acide benzoïque	5	5	1,47	27,0
Acide salicylique	5	5	2,47	14,90
Acide o-amino benzoïque	5	5	4,90	10,80
3°) Colonne SE 30. Après transformation en dérivés silylés par le BSA dans la pyridine.				
Acide p-hydroxy-benzoïque ..	5	5	4,85	17
Ester méthylique de l'acide p-hydroxybenzoïque	5	5	2,60	31

TABL. 4. — Caractéristiques des chromatogrammes en phase gazeuse avec ionisation de flamme.

Les temps de rétention dans les conditions indiquées sont suffisamment distincts pour que les acides soient nettement séparés sur le diagramme, faciles à identifier et à doser (tabl. 4).

Méthode générale d'analyse.

En définitive, le mieux nous a paru être de combiner ces différentes techniques. La première séparation est faite par entraînement à la vapeur d'eau. Les acides benzoïque, salicylique, o-aminobenzoïque, sorbique et déhydroacétique sont recherchés dans le distillat, tandis que l'acide p-hydroxybenzoïque et son ester méthylique sont recherchés sur le résidu de distillation par extraction à l'éther. 5 g de chair de poisson homogénéisé ou 20 ml de couverture sont additionnés de 5 ml d'acide citrique à 60 % avec quelques gouttes d'antimousse. L'entraînement à la vapeur est poursuivi jusqu'à recueillir 300 ml de distillat.

a) Le distillat recueilli sur 1 à 2 ml d'eau de chaux pour éviter les pertes d'acides est neutralisé exactement et lavé par 80 ml d'éther. Il est acidifié par 1 ml d'acide chlorhydrique

concentré et additionné de chlorure de sodium en quantité suffisante pour éviter les émulsions. Il est alors extrait par 50, puis 30 ml d'éther sulfurique. Les extraits étherés réunis et séchés sur sulfate de sodium anhydre sont évaporés à l'évaporateur rotatif.

b) Le résidu étendu à 50 ml environ est saturé de sulfate d'ammonium afin de précipiter complètement les protéines. Après une nuit de repos, la suspension est filtrée sur filtre rapide. Le filtrat est acidifié par 1 ml d'acide chlorhydrique concentré, puis additionné de chlorure de sodium et soumis à l'extraction par l'éther (30 ml, puis 20 ml). Les deux extraits étherés réunis sont séchés sur sulfate de sodium anhydre puis évaporés à l'évaporateur rotatif.

Chacun des deux résidus obtenu de la sorte est repris par 1 à 2 ml d'alcool à 96° pour être chromatographié sur couche mince. La plaque correspondant au distillat est soumise à l'éluant acide, celle venant du résidu à l'éluant basique.

Après révélation par examen UV, traitements aux sels ferroso-ferriques, puis à l'acide thiobarbiturique, on peut repérer l'acide benzoïque, p-chlorobenzoïque, salicylique, o-aminobenzoïque et déhydroacétique sur la « plaque acide », l'acide p-hydroxybenzoïque et son ester méthylique sur la « plaque basique », l'acide sorbique sur les deux.

Si l'un ou l'autre des antiseptiques est présent, il est dosé soit par spectrographie UV, soit par chromatographie en phase gazeuse, selon que la technique est plus ou moins appropriée aux produits qui ont été repérés.

Nous avons donc avec ces différentes techniques le moyen de détecter et de doser l'acide benzoïque, l'acide salicylique, l'acide o-aminobenzoïque, l'acide p-chlorobenzoïque, l'acide p-hydroxybenzoïque et son ester méthylique, l'acide déhydroacétique, l'acide sorbique, à des doses voisines de 10 mg par kg, c'est-à-dire très inférieures à celles qui sont nécessaires pour modifier la durée de conservation des produits. Suivant les résultats de la recherche qualitative, dont la sensibilité est voisine de 1 µg, la méthode la mieux adaptée est choisie pour effectuer le dosage.

BIBLIOGRAPHIE

- DEHOVE (R.A.). — La réglementation des produits alimentaires et non alimentaires. — *Répression des Fraudes et contrôle de la qualité*, 6^e éd., 5 (1), p. 95.
- GOSSELE (J.A.W.) et coll., 1966. — *J. chromatogr.*, 23, p. 305.
- KLEBE (J.F.), TINKBEINER (H.) et WHITE (D.M.), 1966. — Silylations with bis - (triméthyl silyl) acétamide, a highly reactive silyl donor. — *J. Am. Chem. Soc.*, 88, p. 3390-3395.
- MITCHELL (Llyod C.), 1957. — Separation and identification of Acids by paper chromatography. II. Benzoïc, p. hydroxybenzoïc and salicylic acids. — *J. Assoc. Off. agr. Chemists*, 40, p. 592-594.
- VOGEL (A.). — Méthylation des acides en général par le diazométhane. — *Practical organic Chemistry* — 3^e éd., p. 843.
- VOGEL (J.) et DESHUSSES (J.), 1965. — Identification of dehydracetic, sorbic, benzoïc, o. chlorobenzoïc, p. chlorobenzoïc and salicylic acids and of methyl, ethyl, propyl, and butyl esters of p. hydroxybenzoïc acid by gas chromatography. — *Mitt. Gebiete Lebensm.* — *Hyg.*, 56 (1), p. 35-37.