

## FORMATION CONTINUE – ARTICLE DE SYNTHÈSE

**Chimie, sources alimentaires et dosage de la vitamine E**

CUVELIER C., DOTREPPE O., ISTASSE L.

Nutrition, Département des Productions Animales, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Liège B43, Sart-Tilman, 4000 Liège, Belgique

Correspondance : CUVELIER Christine  
ccuvelier@ulg.ac.be

**RESUME :** La vitamine E intervient dans l'inactivation des formes réactives de l'oxygène et est donc impliquée dans la problématique du stress oxydant. La chimie de la vitamine E est relativement complexe. Le terme vitamine E correspond à 2 grands groupes de molécules : les tocophérols et les tocotriénols, comprenant chacun 32 stéréoisomères. La biosynthèse de la vitamine E s'effectue dans les plantes, les algues et les champignons mais pas chez les animaux. Les quantités les plus importantes sont retrouvées dans les céréales et les huiles végétales. Le dosage de la vitamine E est difficile. Après un traitement de l'échantillon avec un solvant organique tel que l'éthanol, il faut procéder à une extraction, réalisée généralement avec de l'hexane. L'identification et la quantification sont réalisées principalement par chromatographie liquide de haute performance en phase normale ou en phase inverse.

**INTRODUCTION**

L'utilisation de la vitamine E dans les aliments pour animaux domestiques est à l'heure actuelle largement répandue. Le but de la présente synthèse est de rappeler différents aspects théoriques concernant la vitamine E. Ce travail aborde le rôle de la vitamine E dans le stress oxydant, sa structure chimique, les sources alimentaires ainsi que les modalités de dosage.

**LE RÔLE DE LA VITAMINE E DANS LA PROBLÉMATIQUE DU STRESS OXYDANT**

Le stress oxydant a été défini par Sies (1991) comme un déséquilibre prononcé entre antioxydants et pro-oxydants en faveur de ces derniers et de leurs effets potentiellement néfastes.

La vitamine E est reconnue comme antioxydant, grâce à sa capacité à inhiber les peroxydations lipidiques (Cheeseman et Slater, 1993). A cet égard, elle participe, avec de nombreuses autres substances, à la lutte contre les formes réactives de l'oxy-

gène (FROs), c'est-à-dire la lutte contre les radicaux libres et les éléments non radicalaires produits lors de la formation de radicaux libres. Il est utile d'identifier la position de la vitamine E parmi les mécanismes de défense contre les FROs. Parmi les auteurs qui se sont intéressés à ce sujet, Kirschvink (2001) propose une classification en 3 groupes :

- la prévention des phénomènes oxydants (transferrine, ferritine, etc);
- l'inactivation des FROs par :
  - transformation des FROs en éléments stables (catalase, superoxyde dismutase et glutathion peroxydase) ;
  - inactivation des FROs par capture de l'électron radicalaire : éléments hydrophiles (acide ascorbique, glutathion, etc) et éléments hydrophobes (vitamine E, caroténoïdes, flavonoïdes, ubiquinol, bilirubine, mélatonine);
- la réparation des lésions induites par les FROs (endonucléases, glycosylases, etc).

**STRUCTURE CHIMIQUE**

La vitamine E fait partie de la famille des tocophérols, nom proposé pour la première fois en 1936 par Evans et collaborateurs. Ce nom provient du grec *tokos* pour progéniture et *pherein* pour porter. Cette famille comprend 4 substances : l' $\alpha$ -tocophérol, qui est la vitamine E proprement dite, le  $\beta$ -tocophérol, le  $\gamma$ -tocophérol et le  $\delta$ -tocophérol.

Ces composés ont, par ailleurs, beaucoup de similitudes structurelles avec 4 autres molécules appartenant à la famille des tocotriénols : l' $\alpha$ -tocotriénol, le  $\beta$ -tocotriénol, le  $\gamma$ -tocotriénol et le  $\delta$ -tocotriénol (Pennock *et al.*, 1964).

La nomenclature des tocophérols (T) et tocotriénols (T<sub>3</sub>) a longtemps été le sujet d'une grande controverse et a souvent prêté à confusion. La commission sur la nomenclature biochimique (International Union of Pure and Applied Chemistry and International Union of Biochemistry and Molecular Biology Joint Commission on Biochemical Nomenclature, 1982) a finalement

préconisé l'utilisation du terme «vitamine E» pour tous les dérivés tocophérols et tocotriénols démontrant qualitativement une activité biologique d' $\alpha$ -tocophérol. Comme cette activité est présente pour les 8 molécules, celles-ci sont donc chacune des «vitamines E» et seront décrites en même temps. Les termes «tocophérol» et «tocotriénol» désignent donc, quant à eux, des entités chimiques bien définies.

L'étude détaillée de la structure chimique de ces molécules est importante pour la compréhension de la méthode d'analyse, du métabolisme ainsi que du mode d'action de la vitamine E.

La structure chimique des tocophérols se compose d'un cycle chromanol mono-, di-, ou tri-méthylé auquel se trouve rattachée une chaîne carbonée latérale (chaîne phytyle) saturée de 16 carbones (Fernholz, 1938). Les tocophérols diffèrent entre eux seule-

ment par le nombre et l'arrangement des groupements méthyles autour du cycle benzène du noyau chromanol (figures 1 et 2).

La structure chimique des tocotriénols se compose également d'un cycle chromanol mono-, di- ou tri-méthylé avec chaîne carbonée latérale, mais celle-ci contient 3 doubles liaisons en position 3', 7' et 11' (figures 3 et 4).

De plus, étant donné leur structure chimique, ce sont des molécules chirales, qui peuvent exister sous différents stéréoisomères. Un bref rappel de quelques éléments de chimie permettra de mieux comprendre la notion de chiralité et de bien percevoir son importance dans le cadre de l'étude de la vitamine E.

Lorsqu'une molécule possède un centre chiral, c'est-à-dire un atome de carbone lié à 4 groupements différents, celle-ci peut exister sous 2 formes distinctes, images l'une de

l'autre dans un miroir, appelées énantiomères. Les énantiomères se différencient l'un de l'autre seulement au niveau de leur chiralité. Ces molécules ont donc des propriétés achirales identiques telles que point de fusion, point d'ébullition, densité, solubilité, etc. A ce titre, elles ne peuvent être séparées l'une de l'autre par des méthodes dépendant de ces propriétés. Mais elles sont dotées de propriétés chirales différentes. Ainsi, les énantiomères ont généralement des propriétés biologiques bien distinctes, car les réactions biologiques qu'ils sous-tendent font, elles aussi appel, à des molécules chirales. Cette particularité sera d'ailleurs mise en évidence plus loin. Une molécule pourvue de 3 centres chiraux peut donc exister sous 8 stéréoisomères différents, répartis en 4 paires d'énantiomères: *RRR-SSS*, *RSR-SRS*, *RRS-SSR*, *RSS-SRR*. *R* et *S* sont des conventions pour *rectus* - à droite - et *sinister* - à gauche - qui font référence au sens horloger ou anti-horloger dans lequel sont attachés les groupements du centre chiral qui ont été classés sur base de leur nombre atomique (Hart, 1987). Chaque tocophérol existe ainsi sous 8 stéréoisomères différents, puisqu'il possède 3 centres chiraux en C<sub>2</sub>, C<sub>4</sub>' et C<sub>8</sub>'. L' $\alpha$ -tocophérol, par exemple, peut avoir les structures *RRR*, *RSR*, *RRS*, *RSS*, *SRR*, *SSR*, *SRS* et *SSS*, mais parmi celles-ci, le seul stéréoisomère retrouvé dans la nature est le (2*R*, 4*R*, 8'*R*)- $\alpha$ -tocophérol, c'est-à-dire le *RRR*- $\alpha$ -tocophérol. Il en va de même pour les autres tocophérols, il existe donc 32 stéréoisomères dans la famille des tocophérols (tableau I).

Dans le commerce, la vitamine E se présente généralement soit sous la forme de *RRR*- $\alpha$ -tocophérol, le stéréoisomère naturel, soit sous une forme synthétique, appelée *all-racemic*- $\alpha$ -tocophérol ou *all-rac*- $\alpha$ -tocophérol, qui est un mélange en quantités à peu près égales des 8 stéréoisomères de l' $\alpha$ -tocophérol.

De plus, la vitamine E peut exister soit sous forme non estérifiée, soit, plus fréquemment, sous forme estérifiée. Les esters de vitamine E s'obtiennent par estérification du groupement hydroxyle en position 6 du cycle chromanol avec de l'acétate, ou encore avec du succinate, du nicotinate ou du phosphate. Ces formes estérifiées ont l'avantage d'être plus stables et moins sensibles à l'oxydation (Ruperez *et al.*, 2001).

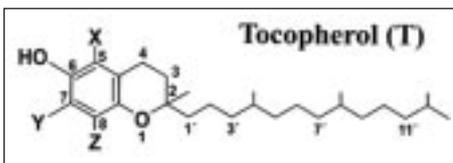


Figure 1: Structure chimique de base des tocophérols. X, Y et Z = H ou CH<sub>3</sub>, d'après Abidi et collaborateurs (2002).

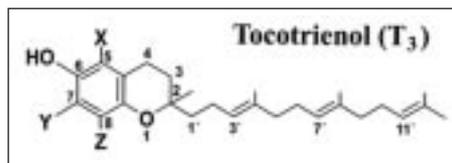


Figure 3: Structure chimique de base des tocotriénols. X, Y et Z = H ou CH<sub>3</sub>, d'après Abidi et collaborateurs (2002).

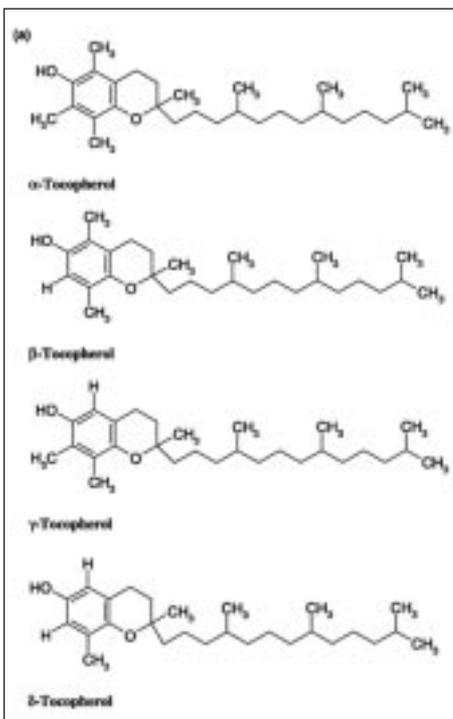


Figure 2: Structure chimique des 4 tocophérols, d'après Lindsay et Astley, 2002

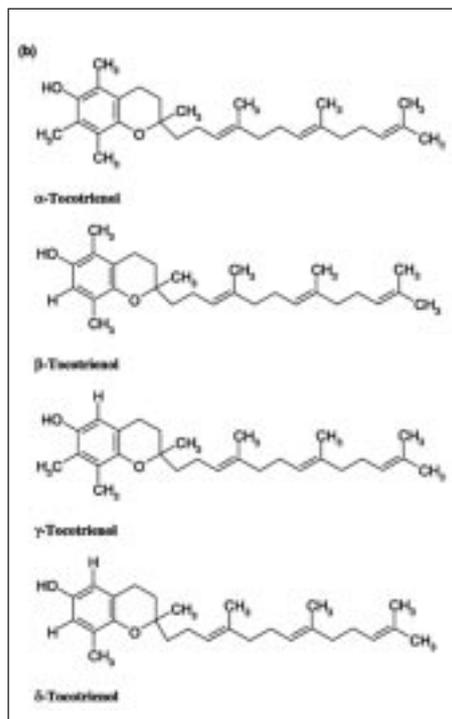


Figure 4: Structure chimique des 4 tocotriénols, d'après Lindsay et Astley, 2002

Tableau I : Les stéréoisomères des tocophérols et des tocotriénols, d'après Abidi, 2000

Stéréoisomère	Homologue			
	α	Isomère de position		δ
		β	γ	
Substitution méthyl				
Nombre	3	2	2	1
Position	C-5, 7, 8	C-5, 8	C-7, 8	C-8
Tocophérol				
1	2R4'R8'R	2R4'R8'R	2R4'R8'R	2R4'R8'R
2	2R4'R8'S	2R4'R8'S	2R4'R8'S	2R4'R8'S
3	2R4'S8'S	2R4'R8'S	2R4'R8'S	2R4'R8'S
4	2R4'S8'R	2R4'R8'S	2R4'R8'S	2R4'R8'S
5	2S4'S8'S	2S4'S8'S	2S4'S8'S	2S4'S8'S
6	2S4'S8'R	2S4'S8'R	2S4'S8'R	2S4'S8'R
7	2S4'R8'R	2S4'R8'R	2S4'R8'R	2S4'R8'R
8	2S4'R8'S	2S4'R8'S	2S4'R8'S	2S4'R8'S
Tocotriénol				
1	2R-tr/tr	2R-tr/tr	2R-tr/tr	2R-tr/tr
2	2R-tr/cis	2R-tr/cis	2R-tr/cis	2R-tr/cis
3	2R-cis/tr	2R-cis/tr	2R-cis/tr	2R-cis/tr
4	2R-cis/cis	2R-cis/cis	2R-cis/cis	2R-cis/cis
5	2S-tr/tr	2S-tr/tr	2S-tr/tr	2S-tr/tr
6	2S-tr/cis	2S-tr/cis	2S-tr/cis	2S-tr/cis
7	2S-cis/tr	2S-cis/tr	2S-cis/tr	2S-cis/tr
8	2S-cis/cis	2S-cis/cis	2S-cis/cis	2S-cis/cis

Les tocotriénols, quant à eux, possèdent un centre chiral en C<sub>2</sub> et 2 sites d'isomérisation géométrique, *cis/trans*, en C<sub>3</sub>' et C<sub>7</sub>'. Il existe donc aussi 32 stéréoisomères de tocotriénols (tableau I). Les tocotriénols rencontrés à l'état naturel possèdent la configuration 2R et *trans/trans* (Pennock *et al.*, 1964).

## BIOSYNTHÈSE ET SOURCES ALIMENTAIRES

### Biosynthèse

La biosynthèse de la vitamine E s'effectue dans les plantes, les algues et certaines plantes non photosynthétiques telles que les champignons mais pas chez les animaux (Threlfall, 1971).

Il existe vraisemblablement 2 voies de synthèse conduisant à la formation de la vitamine E, la voie des tocotriénols et la voie des tocophérols (Janiszowska et Pennock, 1976).

Dans la première, l'acide homogentisique réagit avec une molécule de géranylgeranyl pyrophosphate pour donner un intermédiaire, le 6-géranylgeranyl-toluquinol, qui donnera naissance à un tocotriénol monométhylé,

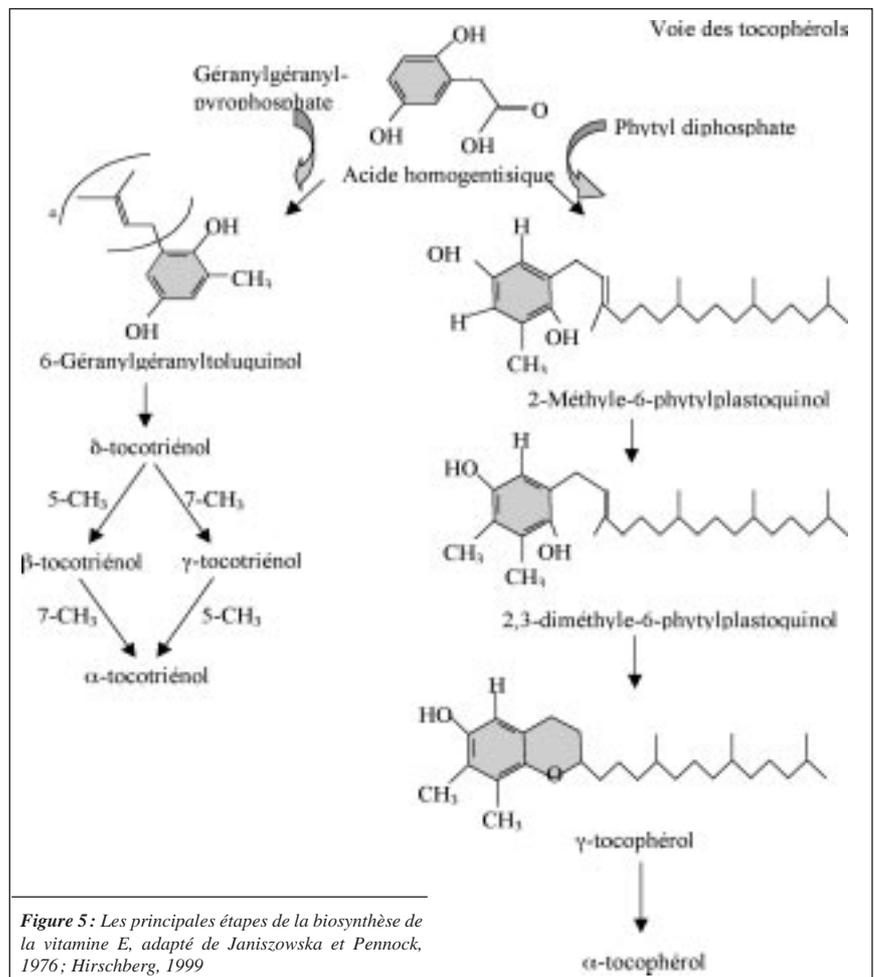


Tableau II : Teneurs en tocophérols et tocotriénols de produits d'origine végétale\*, en mg/kg, d'après Surai, 2002

Aliment	Tocophérols			Tocotriénols	
	$\alpha$ -tocophérol	$\beta$ - et $\gamma$ -tocophérol	$\delta$ -tocophérol	$\alpha$ -tocotriénol	$\beta$ - et $\gamma$ -tocotriénol
Blé	9.0	7.7	0.3	4.2	41.9
Orge	5.7	3.9	0.3	19.5	16.9
Mais	13.7	46.1	-	-	-
Avoine	3.4	1.8	0.4	8.1	1.9
Fève de soja	4.1	19.5	4.7	0.3	0.8
Huile de maïs	488.1	1015.8	31.0	14.0	17.1

\* Teneurs déterminées par chromatographie liquide de haute performance en phase inversée avec détecteur de fluorescence après une extraction par solvant précédée d'une phase de saponification

Tableau III : Teneurs en tocophérols et tocotriénols dans des huiles ou corps gras\*, d'après Bonvehi et collaborateurs (2000)

Aliment	Tocophérols ( $\mu\text{g/ml}$ )			Tocotriénols ( $\mu\text{g/ml}$ )		
	$\alpha$	$\gamma$	$\delta$	$\alpha$	$\gamma$	$\delta$
Huile de palme	198	-	11	210	408	87
Huile de tournesol	765	-	-	-	-	-
Beurre de cacao	14	225	37	9	-	-
Huile de noix	12	517	61	-	-	-
Huile de noix de coco	3	-	13	8	32	-
Huile de noisette	425	68	17	-	-	-
Huile de maïs	263	1365	88	-	-	-

\* Teneurs déterminées par chromatographie liquide en phase inversée avec détecteur de fluorescence après une extraction directe par solvant sans saponification

le  $\delta$ -tocotriénol. Des méthylations supplémentaires permettront d'obtenir le  $\beta$ -tocotriénol, le  $\gamma$ -tocotriénol et l' $\alpha$ -tocotriénol. La chaîne latérale peut ensuite être saturée pour former l' $\alpha$ -tocophérol (Janiszowska et Pennock, 1976).

Lors de la seconde voie de synthèse, une molécule de phytol diphosphate est greffée sur le carbone 6 de l'acide homogentisique simultanément à une réaction de décarboxylation, pour former le 2-méthyle-6-phytylplastoquinol ou phytoltoluquinol. Une méthylation en position 3 permet la synthèse du 2,3-diméthyle-6-phytylplastoquinol, qui subira une étape de cyclisation pour former le  $\gamma$ -tocophérol. Une 2<sup>e</sup> méthylation en position 5 donne l' $\alpha$ -tocophérol (figure 5). La synthèse du  $\delta$ - et du  $\beta$ -tocophérol n'a pas encore été clairement élucidée,

mais il est vraisemblable qu'elle se produise à partir du 2-méthyle-6-phytylplastoquinol (Hirschberg, 1999).

### Sources alimentaires

La nature et la répartition des tocophérols/tocotriénols au sein des aliments font l'objet d'une littérature abondante, jalonnée de contradictions entre les différents auteurs. Ceci est principalement dû, d'une part à l'évolution des méthodes de dosage et d'autre part à la variabilité des teneurs dans les échantillons.

Les sources alimentaires de vitamine E sont soit d'origine végétale, soit d'origine animale (Artur *et al.*, 1994; Bonvehi *et al.*, 2000):

- les produits d'origine végétale constituent la source majeure de vitamine E, les éléments les plus

riches étant les céréales et les huiles;

- les céréales contiennent généralement les 4 formes de tocophérol et très souvent aussi des tocotriénols. Les teneurs en tocophérols et tocotriénols de quelques céréales, ainsi que celles de la fève de soja sont présentées dans le tableau II. Il apparaît que la concentration en  $\alpha$ -tocophérol est relativement faible par rapport à celle en tocotriénols. Par exemple, dans le blé, la teneur en  $\alpha$ -tocophérol est similaire à celle du groupe  $\beta + \gamma$ -tocophérol mais la teneur en  $\beta + \gamma$ -tocotriénol est 3 à 4 fois plus élevée. C'est également le cas pour l'orge. Au niveau de l'avoine, l' $\alpha$ -tocotriénol est la forme prédominante, tandis que dans le maïs et la fève

**Tableau IV :** Teneurs en tocophérols et tocotriénols de produits d'origine végétale, déterminées avec et sans saponification<sup>1</sup>, d'après Bonvehi et collaborateurs (2000)

Aliment	Tocophérols, µg/ml						Tocotriénols, µg/ml					
	α			γ			α			γ		
	α	γ	δ	α	γ	δ	α	γ	δ	α	γ	δ
	Méthode 1			Méthode 2			Méthode 1			Méthode 2		
Huile de palme	167	-	17	201	18	22	180	308	47	218	365	60
Huile de tournesol	584	-	-	672	-	-	-	-	-	-	-	-
Beurre de cacao	-	169	21	13	196	28	-	-	-	15	-	-
Biscuit <sup>2</sup>	31	10	-	45	15	6	7	13	-	11	18	3

<sup>1</sup> Méthode 1 : extraction avec solvant précédée d'une phase de saponification ; méthode 2 : extraction directe avec solvant sans saponification. Teneurs déterminées par chromatographie liquide en phase inversée avec détecteur de fluorescence

<sup>2</sup> Biscuit contenant 10% d'huile de palme et 10% d'huile de tournesol et un ajout de tocophérols comme antioxydant

de soja, le groupe  $\beta + \gamma$ -tocophérol présente les concentrations les plus importantes (Surai, 2002) ;

- les huiles végétales constituent la meilleure source de tocophérols/tocotriénols. A titre d'exemple, les teneurs varient de 10 à 1000 mg/kg dans l'huile de maïs (tableau II). Dans les huiles végétales (tableau III), les formes de vitamine E les plus fréquemment rencontrées à ce niveau sont l' $\alpha$ -tocophérol et le  $\gamma$ -tocophérol. L'huile de palme est la seule à contenir l' $\alpha$ -, le  $\gamma$ - et le  $\delta$ -tocotriénol. Le beurre de cacao et l'huile de noix de coco contiennent également des tocotriénols, mais en moindre quantité. L'huile de tournesol ne renferme que de l' $\alpha$ -tocophérol, qui est aussi la forme prédominante dans l'huile d'olive. Le  $\gamma$ -tocophérol est le représentant majeur dans l'huile de noix et l'huile de maïs. L'huile de soja, quant à elle, contient surtout du  $\gamma$ -tocophérol et du  $\delta$ -tocophérol. Enfin, il faut remarquer que l'huile de noix de coco est l'huile la plus pauvre.
- les fruits et légumes sont également des sources de vitamine E, mais dans une moindre mesure :
  - les fruits contiennent des quantités faibles, à l'exception des mûres (4,3mg/100g). Les pommes et les poires renferment plus de vitamine E dans la peau que dans la chair ;
  - dans les légumes, le taux de vitamine E dépend de la partie de la plante, il est élevé dans les feuilles et surtout dans les feuilles vertes à maturité.
- au niveau des produits d'origine

animale, il faut signaler que la vitamine E est présente essentiellement sous forme d' $\alpha$ -tocophérol mais en quantité assez restreinte dans les tissus animaux (muscles et organes). Dans le lait de vache, la forme  $\alpha$ -tocophérol est largement prédominante. La richesse en vitamine E du lait et des produits qui en dérivent dépend de l'alimentation des vaches.

## DOSAGE DE LA VITAMINE E

Le choix de la méthode analytique dépend en premier lieu du but poursuivi lors de l'analyse, et ensuite de la nature de l'échantillon. Il s'agit donc de déterminer quel est l'analyte recherché. Certaines analyses ont pour seul but d'identifier l' $\alpha$ -tocophérol. D'autres visent la détermination de l'ensemble des tocophérols et tocotriénols, voire même celle de leurs métabolites. Enfin, certaines méthodes s'intéressent en plus à la structure des molécules.

### Extraction

Les techniques d'extraction dépendent de la nature des échantillons qui peuvent être solides ou liquides et d'origine animale ou végétale.

La vitamine E doit être extraite à partir de l'échantillon, et dans de nombreux cas, concentrée avant analyse, à l'exception des huiles végétales qui peuvent être directement analysées, après une dilution, au moyen d'un système de chromatographie liquide de haute performance (Ruperez *et al.*, 2001). Les formes estérifiées de la vitamine E sont hydrolysées au préalable, le plus souvent par une hydrolyse alcaline.

L'échantillon doit en premier lieu être traité par un solvant organique. Cette phase précède ou est simultanée à une phase de saponification ou à un processus d'extraction (Abidi, 2000 ; Bonvehi *et al.*, 2000 ; Ruperez *et al.*, 2001). Elle a pour but de rompre les structures dans lesquelles la vitamine E pourrait être intégrée (membranes, lipoprotéines, gouttelettes lipidiques,...), d'éliminer toute interférence avec de grosses molécules telles que les protéines et les hydrates de carbone qui ne sont pas solubles dans la phase organique et de créer un milieu dans lequel les analytes seront solubles et pourront évoluer librement. Ce solvant organique est généralement de l'éthanol, mais le méthanol est aussi parfois utilisé.

Le traitement de l'échantillon inclut souvent une phase de saponification. La saponification avant extraction est classiquement pratiquée en chauffant l'échantillon avec de l'hydroxyde de potassium, généralement dans de l'éthanol ou du méthanol. Principalement employée pour les échantillons d'origine animale ou pour les aliments, la saponification a cependant le désavantage de provoquer une oxydation des vitamines liposolubles. Des antioxydants, tels que le butylhydroxytoluène, l'acide ascorbique ou le pyrogallol sont donc parfois ajoutés, seuls ou en combinaison pour lutter contre cette oxydation.

Après la phase de saponification, les éléments non saponifiables, tels que la vitamine E, sont extraits dans un solvant organique, alors que les sels d'acides gras, le glycérol et les autres substances potentiellement interférentes restent dans la phase alcaline aqueuse. Les solvants les plus cou-

ramment utilisés pour l'extraction de la vitamine E sont l'acétone, le diéther, le chloroforme-méthanol (2 :1) (extraction de Folch), et enfin, le plus fréquent, l'hexane, seul ou avec de petites quantités de solvants plus polaires tels que l'éthanol, l'acétate d'éthyle ou le diisopropyléther. L'extraction est habituellement réalisée en utilisant des systèmes agitateurs, tels que par exemple le vortex, pour permettre une bonne pénétration du solvant dans les tissus (Ruperez *et al.*, 2001).

Bonvehí et collaborateurs (2000) ont comparé les teneurs en tocophérols et tocotriénols de différents échantillons d'origine végétale, obtenues avec et sans saponification. Il est apparu que les quantités des homologues de la vitamine E étaient augmentées de  $\pm 20\%$  avec la méthode d'extraction sans saponification (tableau IV).

Des résultats semblables ont été rapportés par Katsanidis et Addis (1999) qui ont comparé les teneurs en vitamine E dans des échantillons de tissu musculaire en pratiquant une extraction avec et sans saponification. Il faut remarquer ici que le muscle contient des taux élevés de protéines, ce qui peut interférer avec le processus classique d'extraction. En effet, le méthanol, souvent utilisé, est un très bon extractant pour la vitamine E contenue dans les échantillons de céréales, mais s'il est utilisé pour extraire la vitamine E du tissu musculaire, il extrait également les protéines du muscle et les dénaturent, ce qui empêche toute analyse ultérieure. Il est donc nécessaire, pour ce type d'échantillon, d'appliquer une méthode d'extraction sans méthanol (Liu *et al.*, 1996). A nouveau, les résultats obtenus ont été très différents selon qu'il y a eu, ou non, une phase de saponification. La méthode utilisant la saponification permet de quantifier les formes  $\alpha$ ; par contre, les autres formes de vitamine E, et surtout les formes  $\delta$ , sont rapidement dégradées pendant le processus de saponification. Cette sensibilité peut être associée au fait qu'il n'y a qu'un seul groupement méthyle sur le cycle chromanol des formes  $\delta$ , ce qui diminue la protection des groupements hydroxyles par rapport aux formes  $\alpha$  qui possèdent 3 groupements méthyles sur ce cycle. Il est donc vraisemblable, qu'en cas de saponification de l'échantillon, le contenu en  $\delta$  mais aussi en  $\gamma$ -tocophérol/tocotrié-

nol soit sous-estimé. A l'opposé, la méthode sans saponification a permis de quantifier les formes les plus sensibles, c'est-à-dire les  $\gamma$  et  $\delta$ .

### Techniques de séparation

L'analyse de la vitamine E dans l'extrait brut est réalisée au moyen de techniques chromatographiques, principalement (Abidi, 2000) :

- la chromatographie sur couche mince (*Thin Layer Chromatography*, TLC);
- la chromatographie en phase gazeuse (*Gas Chromatography*, GC);
- la chromatographie liquide de haute performance en phase normale (HPLC en phase normale);
- la chromatographie liquide de haute performance en phase inversée (HPLC en phase inverse);
- l'électrochromatographie capillaire (*Capillary Electrochromatography*, CEC).

Parmi ces techniques de chromatographie, la chromatographie sur couche mince est la méthode la moins coûteuse en terme d'appareillage et d'instruments, mais elle ne permet pas une détermination strictement quantitative. Elle est ainsi utilisée pour la préparation des échantillons, leur purification, la détermination qualitative des antioxydants et l'estimation grossière des quantités contenues dans l'échantillon.

Depuis l'apparition de la chromatographie liquide de haute performance, cette dernière est largement utilisée pour l'analyse des antioxydants liposolubles. La HPLC a en effet surpassé

la chromatographie en phase gazeuse, car elle nécessite une préparation des échantillons moins fastidieuse et des conditions de température de colonne moins élevées, ce qui évite la perte de composés labiles (Abidi, 2000). Actuellement, l'intérêt principal de la GC est son utilisation de façon couplée à un spectromètre de masse (GC-MS) pour obtenir des informations sur la structure chimique des analytes, ainsi que pour identifier les stéréoisomères de la vitamine E. Cette identification, qui se réalise via un marquage isotopique des stéréoisomères, se révèle être particulièrement intéressante dans le cadre de l'étude du métabolisme de la vitamine E (Ingold *et al.*, 1987).

Les procédures de travail avec la HPLC sont dictées par le degré de complexité des matrices étudiées, ainsi que par le type et la concentration des antioxydants. En effet, l'analyse des tocophérols et tocotriénols dans les huiles végétales peut être réalisée directement par HPLC, en raison de l'homogénéité de l'échantillon et de la spécificité de la technique. Seule une purification faible de l'échantillon est nécessaire, ce qui évite des pertes indésirables. Par contre, des échantillons issus de matrices plus complexes doivent passer par une étape de TLC ou par tout autre prétraitement chromatographique, pour éliminer les substances endogènes interférentes (Abidi, 2000).

La technique HPLC en phase normale a été adoptée par de nombreux chercheurs comme méthode de choix pour l'identification des antioxydants liposolubles tocots, en raison de la sépa-

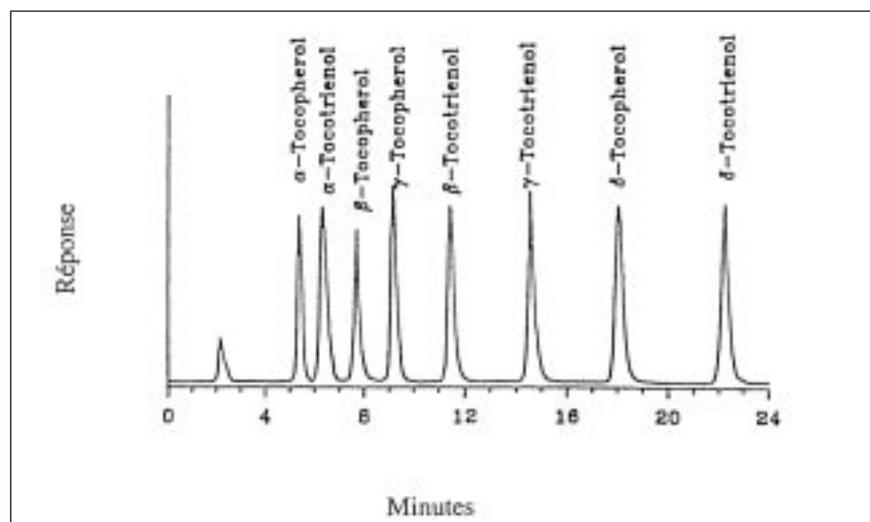


Figure 6: Analyse des tocophérols et tocotriénols par chromatographie liquide de haute performance en phase normale avec détecteur de fluorescence, d'après Schuep et Rettenmaier, 1994.

ration relativement facile des isomères  $\beta$  et  $\gamma$  tocophérols et tocotriénols, qui, rappelons-le, possèdent chacun 2 groupements méthyles sur le cycle chromanol (Tan et Brzuskiwicz, 1989). En effet, la HPLC en phase normale avec phase stationnaire à base de silice présente une grande sélectivité et permet de différencier les nombreuses formes d'antioxydants tocophérols et tocotriénols, comme le montre le chromatogramme de la figure 6.

La technique de HPLC en phase inversée ne permet pas, quant à elle, de séparer les formes  $\beta$  et  $\gamma$  tocophérols et tocotriénols. On visualise d'ailleurs très bien cette différence au niveau de la figure 7 avec 2 pics distincts dans le chromatogramme A, obtenu par HPLC en phase normale et un pic unique pour le  $\beta$  et le  $\gamma$ -tocophérol dans le chromatogramme B, obtenu par HPLC en phase inverse. Lors d'une HPLC en phase normale, l'élution se fait par ordre croissant de polarité. Les analogues de polarité plus faible ( $\alpha$ -tocophérol et  $\alpha$ -tocotriénol) sont donc élués en premier et ceux de polarité plus grande ( $\delta$ -tocophérol et  $\delta$ -tocotriénol) en dernier. Ainsi, une colonne en phase normale permet une séparation basée tant sur

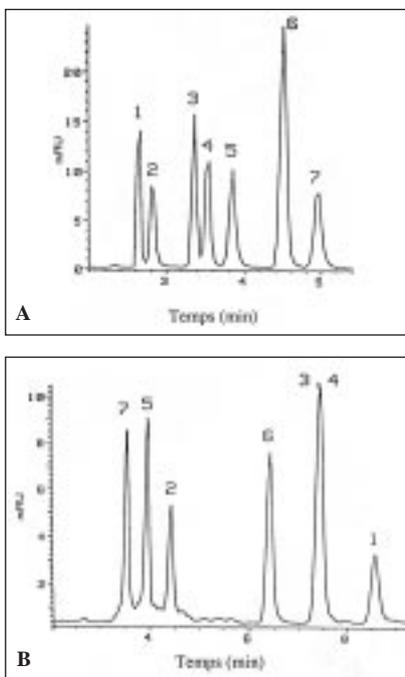
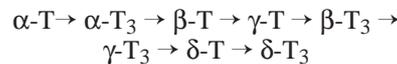


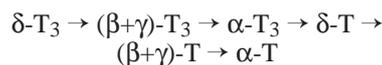
Figure 7 : Analyse des tocophérols et tocotriénols par chromatographie liquide de haute performance en phase normale (A) et en phase inversée (B). 1 correspond à l' $\alpha$ -tocophérol, 2 à l' $\alpha$ -tocotriénol, 3 au  $\beta$ -tocophérol, 4 au  $\gamma$ -tocophérol, 5 au  $\alpha$ -tocotriénol, 6 au  $\delta$ -tocophérol et 7 au  $\delta$ -tocotriénol, d'après Tan et Brzuskiwicz, 1989.

le nombre de groupements méthyles que sur leur position sur le cycle chromanol. Cette séparation indique que la polarité des tocophérols et tocotriénols diminue avec l'augmentation du nombre de groupements méthyles (Tan et Brzuskiwicz, 1989). L'élution des tocophérols et tocotriénols dans une phase normale respecte donc l'ordre suivant :



Les tocophérols  $\alpha$  et  $\delta$  sont suivis de leur analogue insaturé (respectivement l' $\alpha$ -tocotriénol et le  $\delta$ -tocotriénol), vraisemblablement à cause des très faibles différences de polarité existant entre ces composés (Abidi, 2000).

Lors d'une HPLC en phase inverse avec phase stationnaire traditionnelle d'octadécylsilice (ODS), une séparation nette des composés à chaîne latérale saturée et insaturée se produit, et ce sont les tocophérols les moins polaires qui sont retenus le plus longtemps dans la phase stationnaire. L'ordre d'élution dans chaque classe de tocols va ainsi du composé le plus polaire ( $\delta$ -tocophérol et  $\delta$ -tocotriénol) à celui le moins polaire ( $\alpha$ -tocophérol et  $\alpha$ -tocotriénol). La chaîne latérale interagit avec la phase stationnaire de telle manière que les tocophérols restent dans la colonne plus longtemps que les tocotriénols. L'élution se fait ainsi par ordre croissant d'hydrophobicité :



où les formes  $\beta$  et  $\gamma$  co-éluent (Tan et Brzuskiwicz, 1989 ; Abidi, 2000).

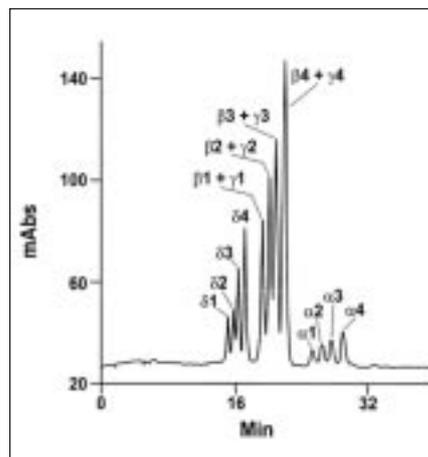


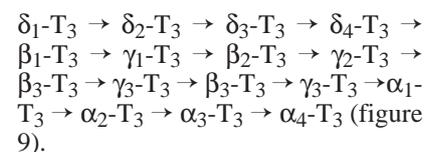
Figure 8 : Séparation des tocotriénols par HPLC en phase inverse sur phase stationnaire d'ODS. 1 correspond à la configuration *cis/cis*, 2 *cis/trans*, 3 *trans/cis*, et 4 *trans/trans*, d'après Abidi, 1999.

Bien que ne permettant pas la séparation des isomères  $\beta$  et  $\gamma$ , la technique de HPLC en phase inverse a pourtant été largement utilisée pour les échantillons ne contenant qu'un seul des deux isomères  $\beta/\gamma$ , comme c'est par exemple le cas pour la majorité des huiles végétales dépourvues de  $\beta$ -tocophérol, ainsi que pour l'analyse des échantillons où la séparation de ces formes n'était pas nécessaire pour l'expérience en cours.

Cette technique présente cependant certains avantages, tels qu'une bonne reproductibilité des temps de rétention et des pics chromatographiques, une équilibration plus rapide, une stabilité de colonne plus grande et la possibilité de coupler cette technique avec une méthode de détection performante, la détection électrochimique (Abidi, 2000 ; Bonvehi *et al.*, 2000). Enfin, à l'opposé de la HPLC en phase normale, la HPLC en phase inverse permet de mettre en évidence les différents isomères géométriques *cis/trans* des tocotriénols, comme illustré dans la figure 8. Douze pics sont observables sur ce chromatogramme, obtenu par HPLC en phase inverse avec phase stationnaire d'ODS, le  $\beta$  et le  $\gamma$ -tocotriénol de chaque configuration formant un pic unique. Pour chaque homologue, l'ordre d'élution est le même :

*cis/cis*  $\rightarrow$  *cis/trans*  $\rightarrow$  *trans/cis*  $\rightarrow$  *trans/trans*, conformément aux polarités respectives (Abidi, 1999).

Au cours des dernières années, la mise au point de nouvelles phases stationnaires dépourvues d'ODS a permis la séparation des isomères  $\beta$  et  $\gamma$  tocophérols et tocotriénols en HPLC phase inverse (Richheimer *et al.*, 1994 ; Abidi et Mounts, 1997 ; Rentel *et al.*, 1998 ; Strohschein *et al.*, 1998 ; Abidi, 1999). Abidi (1999) a ainsi mis en évidence les 16 isomères géométriques des tocotriénols en utilisant une HPLC en phase inverse sur phase stationnaire d'alcool d'octadecanoyl polyvinyl. Avec cette technique, le  $\beta$  et le  $\gamma$ -tocotriénol présentent effectivement des pics chromatographiques distincts, dans l'ordre d'élution :



De plus, on a démontré récemment que l'estérification du groupement hydroxyle en position 6 du noyau

chromanol des isomères  $\beta$  et  $\gamma$ -tocophérols permet leur séparation sur phase stationnaire traditionnelle d'ODS. Remplacer le groupement hydroxyle par une fonction ester semble donc accentuer la différence d'hydrophobicité de ces composés sur phase ODS (Abidi et Mounts, 1997).

A la lumière de ces récentes découvertes, l'analyse des antioxydants tococols par la méthode de la HPLC en phase inverse est donc très prometteuse.

Enfin, il faut signaler la technique de l'électrochromatographie capillaire, qui a récemment été testée pour l'analyse des tocophérols et des tocotriénols. Il s'est avéré cependant que, dans les conditions expérimentales utilisées, elle était d'un intérêt relativement limité, puisqu'elle ne permettait pas la séparation des isomères de position  $\beta$  et  $\gamma$  (Abidi et Rennick, 2001).

### Techniques de détection

Les différentes techniques évoquées ci-dessus permettent la séparation des molécules. Pour finaliser la chromatographie, il faut détecter celles-ci. Dans le cas de la technique de HPLC, il existe plusieurs méthodes de détection (Abidi, 2000) :

- détecteur à diffusion de lumière (ELSD: *evaporative light-scattering detection*) ;
- détecteur ultraviolet (UV : *ultra-violet absorbance detection*) ;
- détecteur de fluorescence (FL : *fluorescence detection*) ;
- détecteur électrochimique (ED : *electrochemical detection*).

Parmi ces techniques, l'ED est reconnue comme étant la plus sensible et s'est révélée être très utile pour l'analyse des antioxydants séparés par HPLC en phase inverse. Elle ne peut cependant être couplée avec une HPLC en phase normale en raison

d'une incompatibilité entre les phases mobiles non aqueuses de la HPLC en phase normale et les interfaces utilisées avec le détecteur électrochimique. La HPLC-ED en phase inverse constitue donc jusqu'à présent la méthode la plus spécifique et la plus sensible pour les composés tocophérols et tocotriénols. Ceux-ci peuvent être détectés avec une sensibilité de l'ordre du picogramme.

En ce qui concerne les autres techniques de détection, leur sensibilité respecte l'ordre suivant :

ED  $\rightarrow$  FL  $\rightarrow$  UV  $\rightarrow$  ELSD

Une perte de sensibilité de 10 à 20 fois s'observe en passant de la technique ED à la technique FL. Cette dernière est néanmoins largement employée, car elle est d'une utilisation plus simple et est compatible tant avec une HPLC en phase normale qu'avec une HPLC en phase inverse (Abidi, 2000; Ruperez *et al.*, 2001). Elle présente une sensibilité et une spécificité plus grandes que celles de la technique UV, mais possède le désavantage de ne pas détecter les formes estérifiées de la vitamine E à l'inverse du détecteur ultraviolet (Hoehler *et al.*, 1998).

Une perte de sensibilité de  $10^3$  à  $10^4$  s'observe lorsqu'on passe de la technique ED à la technique UV (Abidi, 2000). Dans la littérature, les limites de détection de la vitamine E dans le plasma ou dans le sérum par le détecteur UV sont variables et de l'ordre de 0,8 mg/ml (Catignani et Bieri, 1983), de 0,5  $\mu$ g/ml (Lee *et al.*, 1992), de 2,5  $\mu$ g/ml (Zaman *et al.*, 1993) et de 0,2  $\mu$ g/ml (Sowell *et al.*, 1994).

Depuis quelques années, des techniques HPLC couplée à la spectrométrie de masse (MS) ou à la résonance magnétique nucléaire (NMR) se sont développées (HPLC-MS, HPLC-NMR). Elles permettent non seulement de séparer et de quantifier les analytes, mais constituent aussi un excellent moyen pour découvrir la structure de nouveaux antioxydants ou pour confirmer celle des antioxydants déjà connus (Strohschein *et al.*, 1999; Abidi, 2000).

La séparation chirale des tocophérols et tocotriénols synthétiques est d'un intérêt majeur pour les études relatives à la nutrition et au métabolisme. Une première méthode combi-

nant HPLC et GC a permis de séparer les stéréoisomères de l'acétate d' $\alpha$ -tocophérol. Les 8 molécules ont ainsi été séparées par HPLC en 2 groupes selon la configuration 2R/2S et les 4 stéréoisomères de chaque groupe ont ensuite été séparés par GC (Vecchi *et al.*, 1990). En 1994, Riss et collaborateurs ont réalisé la séparation des 8 stéréoisomères de l' $\alpha$ -tocophérol en utilisant une HPLC à phase chirale. Cette nouvelle méthode combinait elle aussi la HPLC et la GC et faisait apparaître 5 pics chromatographiques lors de la HPLC, dont l'analyse par GC de l'un d'entre eux révélait 4 stéréoisomères.

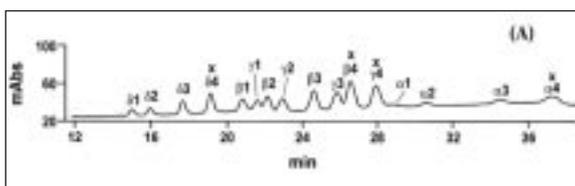
### CONCLUSIONS

La substance que l'on nomme dans le langage courant « vitamine E » est en réalité un terme générique qui englobe un grand nombre de molécules de structure chimique proche mais différente. Elles sont classées en 2 catégories majeures : les tocophérols et les tocotriénols. Ces substances font partie des antioxydants. La vitamine E existe sous forme synthétique et sous forme naturelle surtout dans les produits d'origine végétale. Son dosage relève d'un procédé complexe. La technique la plus fréquemment utilisée à l'heure actuelle est la chromatographie liquide de haute performance couplée à un détecteur électrochimique, ultraviolet ou de fluorescence.

### Chemistry, nutritional sources and analyses of vitamin E

### SUMMARY

Vitamin E is part of the defence mechanisms for the inactivation of free radicals and is therefore implicated in the oxidative stress. Chemistry of vitamin E is relatively complex. Vitamin E includes 2 large groups of molecules: tocopherols and tocotrienols, each of them including 32 stereoisomers. Vitamin E is synthesized in plants, algae and moulds but not in animals. The greatest quantities of vitamin E are found in cereals and vegetable oils. Vitamin E analyses



**Figure 9 :** Séparation des tocotriénols par HPLC en phase inverse sur phase stationnaire d'alcool d'octadécanoyle polyvinyle. 1 correspond à la configuration cis/cis, 2 cis/trans, 3 trans/cis, et 4 trans/trans. X indique les composés naturels, d'après Abidi, 1999.

are difficult. After a treatment of the sample with an organic solvent such as ethanol, vitamin E is usually extracted into hexane.

Identification and quantification are carried on mainly by chromatography, such as normal-phase liquid chromatography or

reversed-phase liquid chromatography.

## BIBLIOGRAPHIE

- ABIDI S.L., MOUNTS T.L. Reversed-phase high-performance liquid chromatographic separations of tocopherols. *J. Chromatogr. A*, 1997, **782**, 25-32.
- ABIDI S.L. Reversed-phase retention characteristics of tocotrienol antioxidants. *J. Chromatogr. A*, 1999, **844**, 67-75.
- ABIDI S.L. Chromatographic analysis of tocol-derived lipid antioxidants. *J. Chromatogr. A*, 2000, **881**, 197-216.
- ABIDI S.L., RENNICK K.A. Capillary electrochromatographic evaluation of vitamin E-active oil constituents: tocopherols and tocotrienols. *J. Chromatogr. A*, 2001, **913**, 379-386.
- ABIDI S.L., THIAM S., WARNER I.M. Elution behavior of unsaponifiable lipids with various capillary electrochromatographic stationary phases. *J. Chromatogr. A*, 2002, **949**, 195-207.
- ARTUR Y., CALS M.J., CLERC M., COVI G., CRASTES DE PAULET A., CRUZ-PASTOR M., HERBETH B., LASCHI-LOQUERIE A., LECLERCQ M., MAZIERE J.C., MOUNIE J., NICOL M., TROUPEL S., VERNET M.H. Actualisation des données relatives aux tocophérols en biochimie clinique. *Ann. Biol. Clin. Paris*, 1994, **52**, 9-31.
- BONVEHI J.S., COLL F.V., RIUS I.A. Liquid chromatographic determination of tocopherols and tocotrienols in vegetable oils, formulated preparations, and biscuits. *J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int.*, 2000, **83**, 627-634.
- CATIGNANI G.L., BIERI J.G. Simultaneous determination of retinol and  $\alpha$ -tocopherol in serum or plasma by liquid chromatography. *Clin. Chem.*, 1983, **29**, 708-712.
- CHEESEMAN K.H., SLATER T.F. An introduction to free radical biochemistry. *Br. Med. Bull.*, 1993, **49**, 481-493.
- EVANS H.M., EMERSON O.H., EMERSON G.A. The isolation from wheat-germ oil of an alcohol,  $\alpha$ -tocopherol, having the properties of vitamin E. *J. Biol. Chem.*, 1936, **113**, 319.
- FERNHOLZ E.J. Constitution of  $\alpha$ -tocopherol. *J. Am. Chem. Soc.*, 1938, **60**, 700-710.
- HART H. Stereoisomerism. In: Hart H., Organic chemistry, a short course. Seventh edition. Houghton Mifflin Company: Boston, 1987, 135-161.
- HIRSCHBERG J. Production of high-value compounds: carotenoids and vitamin E. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 1999, **10**, 186-191.
- HOEHLER D., FROHLICH A.A., MARQUARDT R.R., STELSOVSKY H. Extraction of  $\alpha$ -tocopherol from serum prior to reversed-phase liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.* 1998, **46**, 973-978.
- INGOLD K.U., BURTON G.W., FOSTER D.O., HUGHES L., LINDSAY D.A., WEBB A. Biokinetics of and discrimination between dietary RRR- and SRR- $\alpha$ -tocopherols in the male rat. *Lipids*, 1987, **22**, 163-172.
- INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY AND INTERNATIONAL UNION OF BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY JOINT COMMISSION ON BIOCHEMICAL NOMENCLATURE Nomenclature of tocopherols and related compounds: recommendations 1981. *Eur. J. Biochem.*, 1982, **123**, 473-475.
- JANISZOWSKA W., PENNOCK J.F. The biochemistry of vitamin E in plants. *Vitam. Horm.*, 1976, **34**, 77-105.
- KATSANIDIS E., ADDIS P.B. Novel HPLC analysis of tocopherols, tocotrienols, and cholesterol in tissue. *Free Radic. Biol. Med.*, 1999, **27**, 1137-1140.
- KIRSCHVINK N. Etude du rôle des F<sub>2</sub>-isoprostanes en tant que marqueur et acteur du stress oxydant pulmonaire. (PhD Thesis). Université de Liège: Liège, 2001, 303 p.
- LEE B.L., CHUA S.C., ONG H.Y., ONG C.N. High-performance liquid chromatographic method for routine determination of vitamins A and E and b-carotene in plasma. *J. Chromatogr.*, 1992, **581**, 41-47.
- LINDSAY D.G., ASTLEY S.B. European research on the functional effects of dietary antioxidants: EUROFEDA. *Mol. Aspects Med.*, 2002, **23**, 1-38.
- LIU Q., SCHELLER K.K., SCHAEFER D.M. Technical note: a simplified procedure for vitamin E determination in beef muscle. *J. Anim. Sci.*, 1996, **74**, 2406-2410.
- PENNOCK J.F., HEMMING F.M., KERR J.D. A reassessment of tocopherol chemistry. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1964, **17**, 542-548.
- RENTEL C., STROHSCHHEIN S., ALBERT K., BAYER E. Silver-plated vitamins: a method of detecting tocopherols and carotenoids in LC/ESI-MS coupling. *Anal. Chem.*, 1998, **70**, 4394-4400.
- RICHHEIMER S.L., KENT M.C., BERNART M.W. Reversed-phase high-performance liquid chromatographic method using a pentafluorophenyl bonded phase for analysis of tocopherols. *J. Chromatogr.*, 1994, **677**, 75-80.
- RISS G., KORMANN A.W., GLINZ E., WALTHER W., RANALDER U.B. Separation of the eight stereoisomers of all-*rac*- $\alpha$ -tocopherol from tissues and plasmae high-performance liquid chromatography and capillary gas chromatography. *Methods Enzymol.*, 1994, **234**, 302-310.
- RUPEREZ F.J., MARTIN D., HERRERA E., BARBAS C. Chromatographic analysis of  $\alpha$ -tocopherol and related

- compounds in various matrices. *J. Chromatogr. A*, 2001, **935**, 45-69.
- SCHUEP W., RETTENMAIER R. Analysis of vitamin E homologs in plasma and tissue: high-performance liquid chromatography. *Methods Enzymol.*, 1994, **234**, 294-302.
- SIES H. Oxidative stress : introduction. In : SIES H. , Oxidative stress: oxidants and antioxidants. Academic Press: London, 1991, XV-XXII.
- SOWELL A.L., HUFF D.L., YEAGER P.R., CAUDILL S.P., GUNTER E.W. Retinol,  $\alpha$ -tocopherol, lutein/zeaxanthin,  $\beta$ -cryptoxanthin, lycopene,  $\alpha$ -carotene, trans- $\beta$ -carotene, and four retinyl esters in serum determined simultaneously by reversed-phase HPLC with multiwavelength detection. *Clin. Chem.*, 1994, **40**, 411-416.
- STROHSCHNEIN S., PURSCH M., LUBDA D., ALBERT K. Shape selectivity of C30 phases for RP-HPLC separation of tocopherol isomers and correlation with MAS NMR data from suspended stationary phases. *Anal. Chem.*, 1998, **70**, 13-18.
- STROHSCHNEIN S., RENTEL C., LACKER T., BAYER E., ALBERT K. Separation and identification of tocotrienol isomers by HPLC-MS and HPLC-NMR coupling. *Anal. Chem.*, 1999, **71**, 1780-1785.
- SURAI P.F. Vitamin E. In : Surai P.F., Natural antioxidants in avian nutrition and reproduction. Nottingham University Press: Nottingham, 2002, 27-128.
- TAN B., BRZUSKIEWICZ L. Separation of tocopherol and tocotrienol isomers using normal- and reverse-phase liquid chromatography. *Anal. Biochem.*, 1989, **180**, 368-373.
- THRELFALL D.R. The biosynthesis of vitamins E and K and related compounds. *Vitam. Horm.*, 1971, **29**, 153-200.
- VECCHI M., WALTHER W., GLINZ E., NETSCHER T., SCHMID R., LALONDE M., VETTER W. Chromatographische trennung und quantitative bestimmung aller acht stereoisomeren von  $\alpha$ -tocopherol. *Helv. Chim. Acta*, 1990, **73**, 782-789.
- ZAMAN Z., FIELDEN P., FROST P.G. Simultaneous determination of vitamins A and E and carotenoids in plasma by reversed-phase HPLC in elderly and younger subjects. *Clin. Chem.*, 1993, **39**, 2229-2234.