



I. Introduction

A travers ce projet d'étude, notre objectif est de réaliser le dosage de l'aspartame présent dans certains édulcorants, par la technique d'analyse séparative de chromatographie en phase liquide haute performance (HPLC). Ce procédé est utilisé dans l'industrie agroalimentaire pour contrôler la teneur en aspartame de boissons dites « Light », allégées en sucre.

II. Etat de l'art

C'est en 1965 que l'aspartame est synthétisé pour la première fois, par le chimiste américain James Schlatter.

Être en mesure de doser précisément l'aspartame contenu dans diverses denrées alimentaires s'est alors montré essentiel pour ne pas mettre en danger les consommateurs. La méthode d'analyse chromatographique HPLC est une technique couramment utilisée afin d'identifier la teneur en édulcorant de certains aliments. Dès 1985, G. VERZELLA et A. MANGIA, mettent au point un protocole expérimental de séparation de l'aspartame par méthode HPLC ^[3], dans l'optique de séparer les différents isomères de l'aspartame préalablement synthétisé. Dans notre projet, nous nous sommes inspirés de leur étude pour appréhender le principe de séparation des composés par méthode HPLC. En 1997, Kazimierz Wróbel et Katarzyna Wróbel, déterminent dans leur étude la teneur en aspartame et en phenylalanine présente dans des boissons allégées par méthode d'analyse HPLC et par détection spectrofluorimétrique et spectrophotométrique ^[4]. Le dosage de la phenylalanine est très intéressant puisque c'est cette molécule, issue de l'aspartame, qui est susceptible d'engendrer des problèmes de santé chez le consommateur. Cette étude nous a mené à privilégier la détection des produits par spectrofluorimétrie, si le matériel qui nous est mis à disposition nous le permet, afin d'obtenir des résultats d'analyse plus précis que par spectrophotométrie. Enfin, en 2012, une équipe d'ingénieurs danois et espagnols, détermine la teneur en aspartame de boissons type Cola de diverses marques par méthode HPLC ^[5]. Nous nous sommes inspirés de leurs travaux pour choisir la colonne chromatographique adaptée pour la séparation de nos produits.

III. Principe

Le but de ce projet est de doser l'aspartame dans une boisson commerciale de Coca-Cola zéro en utilisant la chromatographie en Phase Liquide Haute Performance (HPLC). Pour cela, nous allons faire une gamme d'étalonnage puis grâce aux mesures obtenues de la HPLC, nous pouvons tracer le graphique $S=f(C)$. Ainsi, nous pouvons analyser notre échantillon. La HPLC, nous donnera l'aire du pic et ainsi nous pourrions déterminer la teneur d'aspartame dans notre échantillon.

IV. Réactifs, verrerie et appareillage

Réactifs :

- Solution tampon phosphaté
- Acétonitrile
- Aspartame
- Bouteille de Coca Cola Zéro

Matériel :

- 1 Fiole jaugée de 400mL
- 1 Fiole jaugée de 100mL
- 5 fioles jaugées de 50mL
- 2 Bêchers de 50mL
- Pipettes jaugées de 1mL, 2mL, 5mL, 10mL
- 1 Bac à ultrasons
- 1 système de pompes MERCK HITACHI L-7100
- 1 vanne d'injection RHEODYNE, à boucle de 20 µl
- 1 colonne de 150 mm de longueur, diamètre intérieur 4,6 mm, remplissage silice à particules sphériques (diamètre moyen des particules : 5 µm) greffée avec des chaînes C18
- 1 détecteur MERCK HITACHI L-7400

- 1 enregistreur-intégrateur SHIMADZU C-R5A
- 1 seringue de 1 mL

V. Mode opératoire

Préparation des solutions étalons d'aspartame pure à 99% :

Toutes les dilutions finales seront préparées en utilisant de l'eau ultra pure comme solvant.

Pour préparer l'eau ultra pure, diluer 372 ml de tampon phosphaté avec 28 ml d'acétonitrile dans une fiole de 400 mL.

Pour obtenir la solution mère (Sm), diluer 100mg d'aspartame pure dans une fiole jaugée de 100mL compléter jusqu'au trait de jauge avec de l'eau ultra pure. Analyser la solution mère par HPLC, si le pic de l'aspartame est saturé, on dilue cette solution mère de façon à obtenir un pic non-saturé, dans ce cas la solution diluée sera appelée Smd.

A l'aide de fioles jaugées de 50 mL, préparer une gamme de 5 solutions étalons contenant respectivement 0 ; 2,5 ; 5 ; 10 ; 15 et 25 mL de la solution Smd et compléter au trait de jauge avec de l'eau ultra pure.

Préparation de l'échantillons de coca-cola zéro :

Toutes les dilutions finales seront préparées en utilisant de l'eau ultra pure comme solvant.

A l'aide d'une fiole de 100 ml diluer 20 ml de Coca Cola zéro en complétant jusqu'au trait de jauge avec de l'eau ultra pure.

Cette solution sera diluée du même facteur que la solution mère puis elle sera placée dans un bac à ultrasons pour le dégazer.

Manipulations HPLC :

Sur l'enregistreur enter la date et l'heure. Faire le zéro du détecteur puis celui de l'enregistreur.

Enregistrer un chromatogramme de notre solution mère d'aspartame pure en injectant 1 ml de celle-ci en position LOAD puis retirer la seringue et mettre la vanne en position INJECT pour lancer l'analyse.

De la même manière, enregistrer les chromatogrammes de la gamme d'étalon en respectant l'ordre des teneurs croissantes et celui de l'échantillon dilué. [3]

VI. Exploitation des résultats

Pour déterminer la teneur d'un composé en mg/L on réalise d'abord une droite d'étalonnage à partir des chromatogrammes :

On trace la droite d'étalonnage à partir des surfaces $S(\mu V.s)$ des pics en fonction des concentrations (mg/L) des solutions étalons d'aspartame.

Pour cela on réalise un étalonnage externe, et on obtient une équation de droite du type :

$$S = a * C + b$$

Ainsi on obtient : $C = \frac{S-b}{a}$ avec C en mg/L

Ce qui nous permet d'obtenir la concentration de l'aspartame dans la solution échantillon (mg/L). D'après le site de Coca-Cola, nous devons trouver une concentration d'aspartame d'environ 130 mg/L [4].

PS : on peut aussi remplacer la surface du pic par sa hauteur pour réaliser ces calculs. [5]

VII. Annexes

1. Tableau physico-chimique :

Réactifs Solvants Produits	Aspect	T _f (°C)	T _{eb} (°C)	Masse vol (si liq)	Solubilité Eau Solvants	N°SGH	Principaux dangers	Prudences associées
Aspartame N°CAS :22839- 47-0	Solide	249	300		Faiblement soluble dans l'eau et l'éthanol Solubilise plus rapidement dans les solutions acides		Ce n'est pas une substance ni un mélange dangereux conformément au règlement (CE)	-Port des EPI
Acétonitrile N°CAS :75-05-8	Liq	-47	81.6	0.79	Soluble dans l'eau et solvants organiques : éthanol, méthanol	02 : inflammable 07 : Nocif ou irritant	-H225 : Liquide et vapeurs très inflammables -H302 + H312 + H332 : Nocif en cas d'ingestion, de contact cutané ou d'inhalation -H319 : Provoque une sévère irritation des yeux	-P210 : Tenir à l'écart de toutes sources de chaleur -P280 : Port des EPI
Solution tampon de phosphate	Liq				Hautement soluble dans l'eau		Ce n'est pas une substance ni un mélange dangereux conformément au règlement (CE)	-Port des EPI

[6] [7]

2. Bibliographie :

[1] Les boissons « light » associées à une augmentation du risque de diabète de type 2 · Inserm, La science pour la santé. (2013, 7 février). Inserm. Consulté le 19 novembre 2022, à l'adresse <https://www.inserm.fr/actualite/boissons-light-associees-augmentation-risque-diabete-type-2/>

[2] Suez, J. (2014, 17 septembre). Artificial sweeteners induce glucose intolerance by altering the gut microbiota. Nature. Consulté le 19 novembre 2022, à l'adresse https://www.nature.com/articles/nature13793?error=cookies_not_supported&code=1560bdeb-1d1a-40cf-bb48-9b4234f3516d

[3] DETERMINATION OF ASPARTAME IN SOFT DRINKS USING HPLC. (s. d.). Core. Consulté le 19 novembre 2022, à l'adresse <https://core.ac.uk/download/pdf/289972566.pdf>

[4] Combien d'aspartame contiennent les produits Coca-Cola. Consulté le 19 novembre 2022, à l'adresse suivante : <https://fr.coca-cola.ch/contact/questions/aspartam>

[5] TP 5 HPLC Analyse expérimentale en contrôle qualité environnement. Consulté le 19 novembre 2022

[6] ASPARTAME. (s. d.). sordalab. Consulté le 19 novembre 2022, à l'adresse <https://www.sordalab.com/RESSOURCES/documents/FR/20118.pdf>

[7] FICHES DE DONNEES DE SECURITE. (s. d.). ThermoFisher. Consulté le 19 novembre 2022, à l'adresse <https://www.fishersci.fr/store>