

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 phénylalanine présente dans des boissons allégées par méthode d'analyse HPLC et par détection spectrofluorimétrique et spectrophotométrique [4]. Le dosage de la phénylalanine 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 μ L
- 1 colonne de 150 mm de longueur, diamètre intérieur 4,6 mm, remplissage silice à particules sphériques (diamètre moyen des particules : 5 μ m) 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 :

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

Pour préparer l'eau ultra pure, on fera de l'eau permuté dans une résine permettant de la purifier une nouvelle fois.

Pour obtenir la solution mère (Sm), diluer 100mg d'aspartame pur 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 des solutions pour la pompe :

Pour alimenter la colonne on utilisera un mélange de méthanol et de solution tampon de phosphate monopotassique.

Pour la solution de méthanol (Eluant A) on prendra la solution fournie de méthanol purifié.

Pour la solution de Phosphate monopotassique (Eluant B) on doit obtenir une solution à pH=4,5 ; Sachant que le pKa du couple $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$ est de 7,2.

On obtient alors :

$$Ka = \frac{[HPO_4^{2-}] * [H_3O^+]}{[H_2PO_4^-]} \Leftrightarrow [H_2PO_4^-] = \frac{[HPO_4^{2-}] * [H_3O^+]}{10^{-pKa}} = \frac{10^{-4,5} * 10^{-4,5}}{10^{-7,2}} \approx 0,016 M$$

On calcule ainsi la masse de phosphate monopotassique pour obtenir 500mL de solution à pH=4,5 :

$$m_{KH_2PO_4} = [H_2PO_4^-] * V * M(KH_2PO_4) = 0,016 * 0,5 * 136,09 = 1,09g$$

Une fois la masse de phosphate ajoutée aux 500mL d'eau ultra pure, on teste la solution à l'aide d'une sonde pH pour vérifier si celle-ci est bien à pH = 4,5.

Si la solution n'est pas au bon pH on ajoutera quelques gouttes d'acide chlorhydrique, si la solution est trop « basique ». Inversement, on ajoutera quelques gouttes de potasse si la solution est trop « acide ».

Détermination de la composition de la phase mobile :

D'après la littérature, l'éluant optimal pour le dosage de l'aspartame dans une boisson telle que le Coca Zéro est un mélange de Phosphate monopotassique / Acétonitrile de composition 85/15 (v/v). On détermine la polarité de cet éluant, en considérant la polarité du phosphate monopotassique comme étant égale à la polarité de l'eau puisqu'il s'agit d'une espèce en solution aqueuse.

On a :

$$0,85 * \rho_{\text{phosphate monopotassique}} + 0,15 * \rho_{\text{acétonitrile}} = \rho_{\text{éluant}}$$

$$\Leftrightarrow 0,85 * \rho_{\text{eau}} + 0,15 * \rho_{\text{acétonitrile}} = \rho_{\text{éluant}}$$

Application numérique : $\rho_{\text{éluant}} = 0,85 * 10,2 + 0,15 * 5,8 = 9,54$

Or, n'ayant pas d'acétonitrile à disposition, nous le substituons par du méthanol. En revanche, il convient de recalculer les proportions de la nouvelle phase mobile de Phosphate monopotassique / Méthanol, afin d'obtenir une phase mobile de même polarité que précédemment.

$$x * \rho_{\text{phosphate monopotassique}} + y * \rho_{\text{méthanol}} = \rho_{\text{éluant}}$$

$$\Leftrightarrow x * \rho_{\text{eau}} + (1 - x) * \rho_{\text{méthanol}} = \rho_{\text{éluant}}$$

$$\Leftrightarrow x * (\rho_{\text{eau}} - \rho_{\text{méthanol}}) + \rho_{\text{méthanol}} = \rho_{\text{éluant}}$$

$$\Leftrightarrow x = \frac{\rho_{\text{éluant}} - \rho_{\text{méthanol}}}{(\rho_{\text{eau}} - \rho_{\text{méthanol}})}$$

Application numérique : $x = \frac{9,54 - 5,1}{10,2 - 5,1} = 0,87$

Donc pour que le nouvel éluant ait la même polarité que le précédent, on mélange du Phosphate monopotassique / Méthanol en proportion 87/13 (v/v).

Cette composition est théorique, en effet dans la pratique on privilégie un rapport Phosphate monopotassique / Méthanol 70/30 (v/v), qui est suffisant pour identifier correctement le pic de l'aspartame.

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 10 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 la dégazer.

Manipulations HPLC :

Sur l'enregistreur entrer 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

1. Analyse des pics de l'étalon et du coca-cola

1.1. Analyse du pic de l'étalon :

On observe sur la figure 1, deux pics sortant à environ 1,7 min et 2,1min, ces pics correspondent respectivement à la phénylalanine et l'acésulfame K, ce sont deux composés qui ont une absorbance similaire à l'aspartame mais qui ne nous intéresse pas ici. Cependant, on remarque à $t_r = 6,367$ min ; Le pic de l'aspartame qui nous informe du temps auquel on le verra apparaître sur l'échantillon de coca-cola zéro.

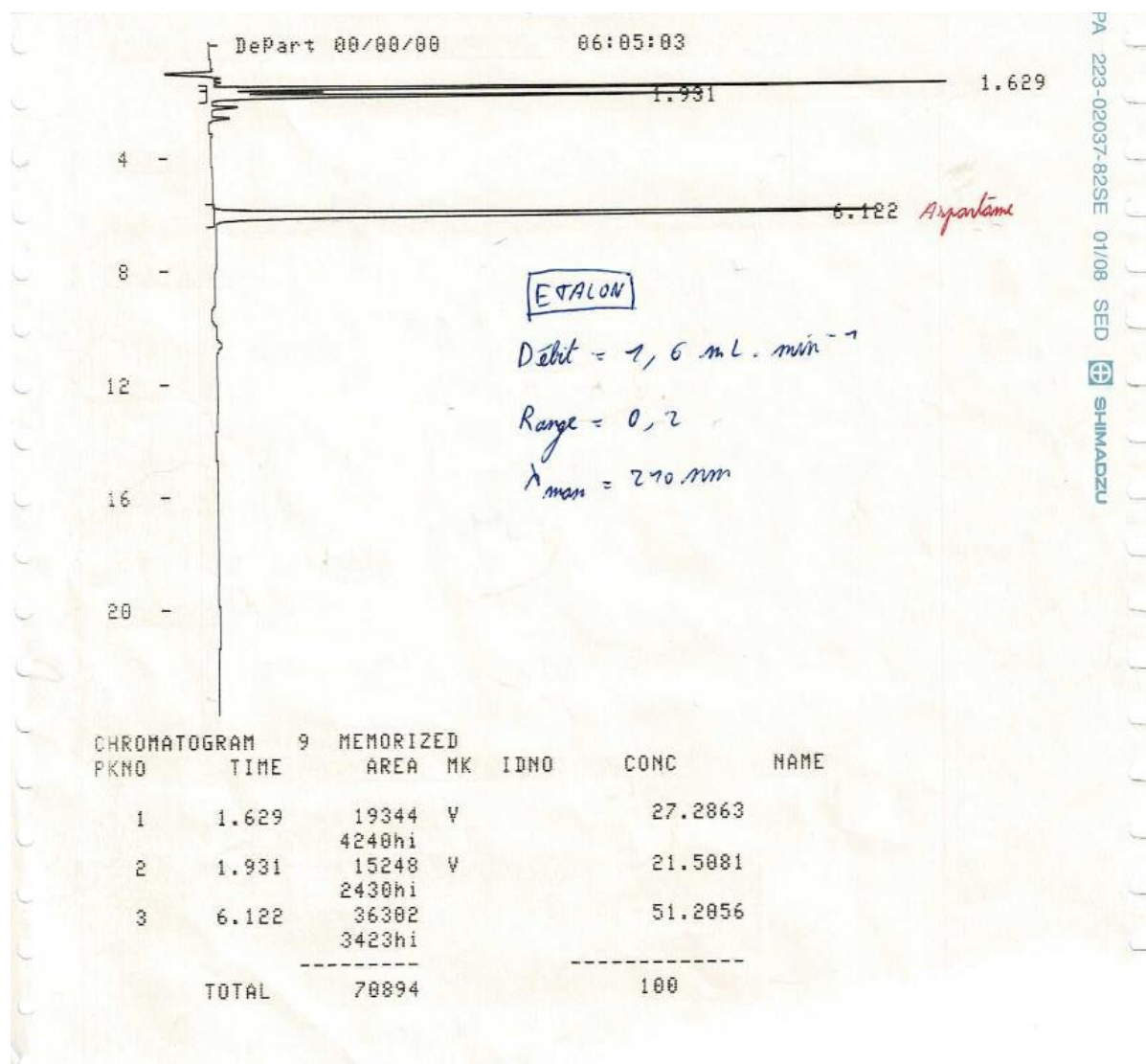


Figure 1 : Chromatogramme de l'aspartame pour $D = 1,5$ mL/min

Sur la figure 3 en annexe, on peut observer un chromatogramme très similaire à celui de la figure 1 ci-dessus, pour un débit de phase mobile égal à 1,6 ml/min. On rappelle ici que l'augmentation du débit fait diminuer les temps de rétentions des composés dans la colonne, ce que l'on peut voir sur la figure 3.

1.2. Analyse du pic du Coca-cola zéro :

On observe sur la figure 2 ci-dessous, un pic ayant un temps de rétention de 6,398 min ce qui est très proche du temps de rétention de l'aspartame de la solution étalon. Ainsi cela nous confirme que l'échantillon contient bien de l'aspartame

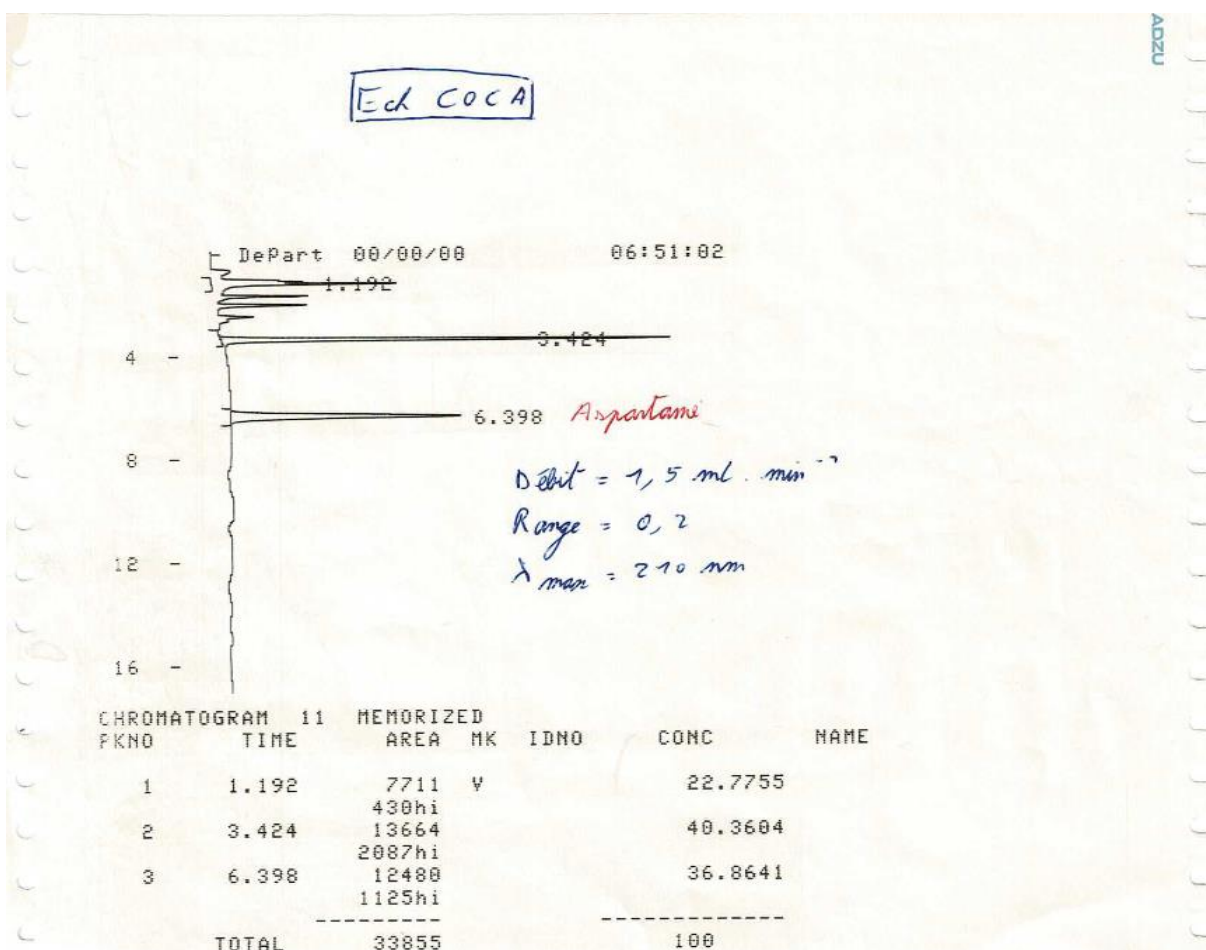


Figure 2 : Chromatogramme de la solution de coca-cola zéro

2. Détermination de la concentration approximative d'aspartame dans l'échantillon de Coca-cola zéro :

La détermination de la concentration en aspartame dans un échantillon ne peut se faire précisément que par l'intermédiaire d'une droite d'étalonnage. C'est d'ailleurs là tout l'intérêt de notre étude. En revanche, après réflexion avec notre tuteur de projet, nous sommes arrivés à la conclusion qu'il est envisageable d'émettre une première estimation approximative de la concentration d'aspartame dans le Coca zéro par proportionnalité, si les conditions expérimentales de l'analyse sont identiques.

$$C_{coca} = \frac{C_{\text{étalon}} * A_{coca}}{A_{\text{étalon}}}$$

$$C_{coca} = \frac{100 * 12480}{39673} = 31,5 \text{ mg.L}^{-1}$$

Avec : C la concentration en aspartame (en mg.L⁻¹)

A l'aire du pic de l'aspartame (sans unité)

Nous remettons en question ce résultat après avoir fait la même étude avec la droite d'étalonnage.

3. Détermination de la concentration en aspartame :

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 : $C = (S - b) / a$

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].

(On peut aussi remplacer la surface du pic par sa hauteur pour réaliser ces calculs.) [5]

VII. Remarques et problèmes rencontrés

Lors des manipulations nous avons rencontré deux problèmes :

D'une part nous avons inversé les proportions de méthanol et de solution tampon, ce qui a faussé nos deux premières mesures. On obtient sur le chromatogramme, visible en annexe (figure 4), un seul pic (élué à $t \approx 1,3 \text{ min}$) contenant tous les composés de la solution d'aspartame. Une fois que nous nous sommes rendu compte de notre erreur nous l'avons corrigé en inversant les proportions du mélange méthanol/tampon (30/70).

D'autre part la longueur d'onde de coupure du méthanol était de 210nm, or la longueur d'onde choisie pour la détection de l'aspartame était elle aussi de 210 nm. Ce qui a créé perte de précision pour les mesures relatives aux pics, car la phase mobile contenant du méthanol absorbait une partie de signal.

En plus de ces deux problèmes, on a pu constater sur le chromatogramme :

- La présence d'artéfacts dus au fait que le solvant utilisé pour diluer l'échantillon était différent du mélange utilisé pour les phases mobiles. Si l'on avait voulu ne plus observer ces artéfacts, il aurait fallu diluer l'échantillon avec un mélange méthanol/Tampon (30/70 ; v/v)
- La présence de deux pics très proches correspondant à la phénylalanine et à l'acésulfame de potassium, tous deux présents dans les sucettes et dans le coca-cola zéro. Ces deux pics pourraient être séparés si l'on modifiait la longueur d'onde d'absorption d'étude et la composition de la phase mobile.

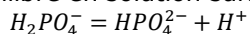
Réglages de la colonne CLHP :

Pour régler les paramètres d'analyse, c'est-à-dire les résultats obtenus pour obtenir les pics d'intégration :

- Nous avons joué sur le range, qui une fois augmenté permettait de faire diminuer la hauteur des pics sur le chromatogramme.
- Nous avons joué sur la valeur du débit qui une fois augmenté, permettait de faire diminuer le temps de rétention des composés dans la colonne.
- Nous avons réglé la longueur d'onde d'absorbance à partir du spectre Uv-Visible de l'aspartame, que l'on peut retrouver en annexe (figure 5).

Rôle du tampon :

L'un des composés de la phase mobile que nous utilisons afin dans cette méthode d'analyse est le Phosphate monopotassique. Cette espèce, de formule brute KH_2PO_4 , est également utilisée en tant que tampon pH. En effet, son pouvoir tampon est issu de l'équilibre en solution suivant :



Cet équilibre fixe le pH aux alentours de 4,5 ce qui permet de maximiser la présence d'une des espèces de cet équilibre acide-base, en l'occurrence l'espèce HPO_4^{2-} . De plus, le phosphate monopotassique, grâce à son pouvoir tampon, est en mesure d'absorber les légères variations de pH qui peuvent survenir au cours de l'analyse.

VIII. Conclusion

Cette première séance de manipulation nous a permis de développer la méthode de dosage de l'aspartame par analyse HPLC. Nous avons pu mettre en pratique nos recherches préalables, en les confirmant et en les rectifiant, afin d'optimiser notre méthode. En manipulant, nous avons pris conscience de la nécessité d'adapter la composition de la phase mobile, quitte à s'éloigner des valeurs théoriques que nous avons déterminé. Nous avons assimilé l'importance du choix de la longueur d'onde d'étude afin d'éviter certains phénomènes parasites tels que les pertes d'absorbance dues au λ_{coupure} des constituants de la phase mobile. Dorénavant, nous sommes en mesure d'établir une droite d'étalonnage via cette méthode d'analyse, afin de déterminer la concentration en aspartame d'un échantillon.

IX. Annexes

1. Tableaux des données 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 blanc	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
Méthanol N°CAS : 67-56-1	Liquide incolore	-98	65	0,791	Soluble dans l'eau et l'acétone	SGH02 : Inflammable SGH06 : Toxique SGH08 : Sensibilisant, mutagène, cancérogène, reprotoxique	H225 : Liquide et vapeurs très inflammables. H301 + H311 + H331 : Toxique par ingestion, par contact cutané ou par inhalation. H370 : Risque avéré d'effets graves pour les organes.	P210 : Tenir à l'écart de toute source d'inflammation. P233 : Maintenir le récipient fermé de manière étanche. P280 : Porter des EPI
Solution tampon de phosphate (KH₂PO₄)	Liquide transparent				Hautement soluble dans l'eau		Ce n'est pas une substance ni un mélange dangereux conformément au règlement (CE)	Port des EPI

[6] [7]

Réactifs Solvants Produits	Aspect	T _f (°C)	T _{eb} (°C)	Mas se vol (si liq)	Solubilité Eau Solvants	N°SGH	Principaux dangers	Prudences associées
HCl N°CAS : 7647-01-0	Liquide incolore	-114	108,6	1,09	Soluble dans l'eau	SGH05 : Corrosif SGH07 : Toxique, irritant, sensibilisant, narcotique	H290: Peut être corrosif pour les métaux. H315: Provoque une irritation cutanée. H319: Provoque une sévère irritation des yeux. H335: Peut irriter les voies respiratoires	P234: Conserver uniquement dans l'emballage d'origine. P261: Éviter de respirer les poussières/ fumées/ gaz/ brouillards/ vapeurs/ aérosols. P264: Se laver la peau soigneusement après manipulation. P271: Utiliser seulement en plein air ou dans un endroit bien ventilé
KOH N° CAS : 1310-58-3	Solide blanc	380	1324	/	Soluble dans l'eau	SGH05 : Corrosif SGH07 : Toxique, irritant, sensibilisant, narcotique	H290: Peut être corrosif pour les métaux. H302: Nocif en cas d'ingestion. H314: Provoque des brûlures de la peau et de graves lésions des yeux.	P234: Conserver uniquement dans l'emballage d'origine. P260: Ne pas respirer les poussières ou brouillards. P280: Porter des gants de protection/ des vêtements de protection/ un équipement de protection des yeux/ du visage/ auditive.

2. Chromatogrammes et Spectre UV-Visible

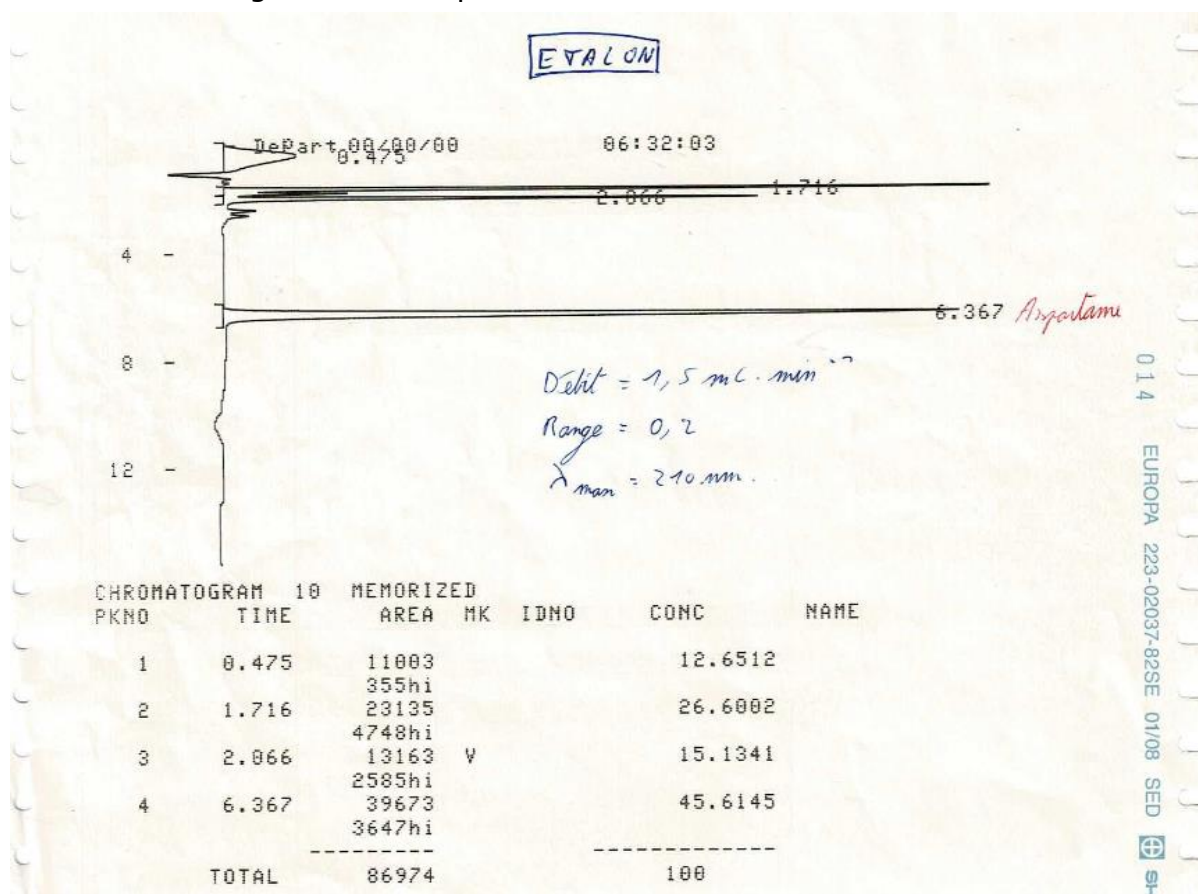


Figure 3 : Chromatogramme de l'aspartame pour D=1,6 mL/min

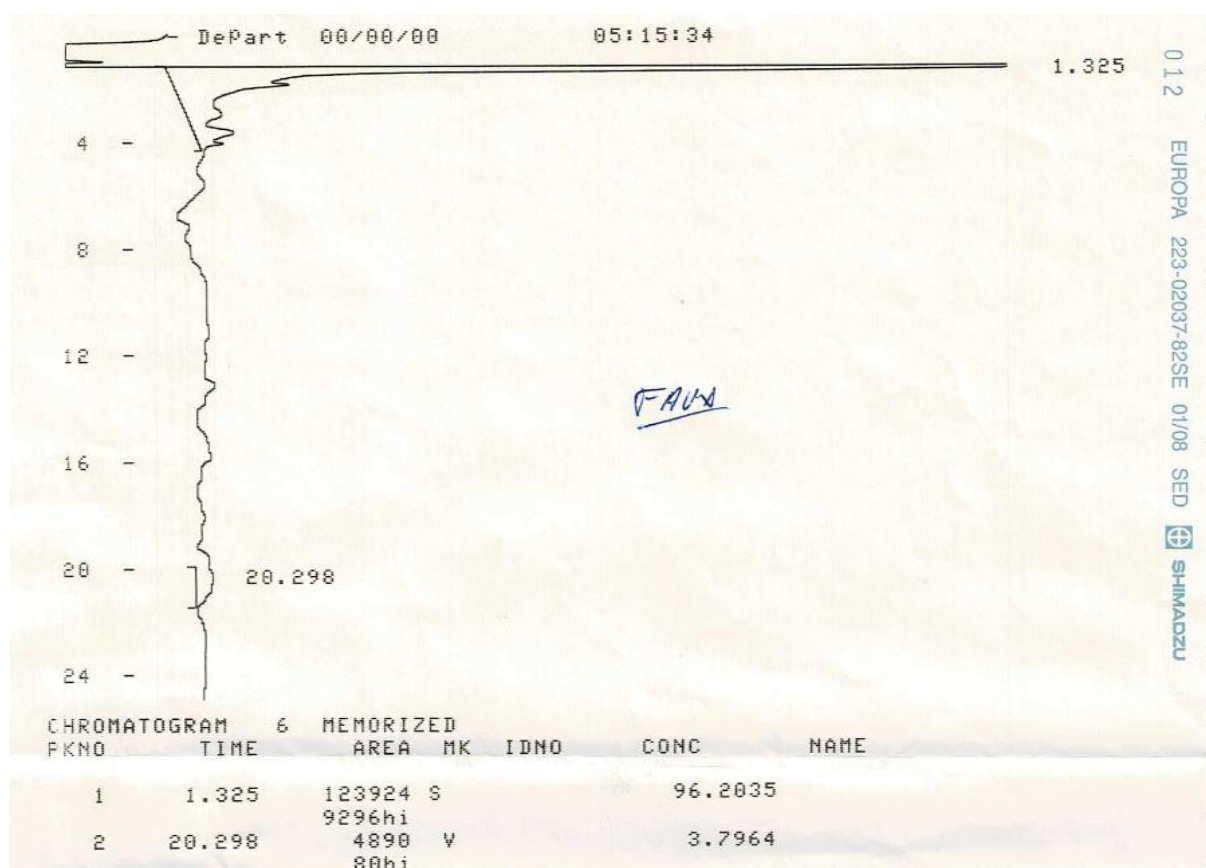


Figure 4 : Chromatogramme erroné pour une phase méthanol/tampon (70/30)

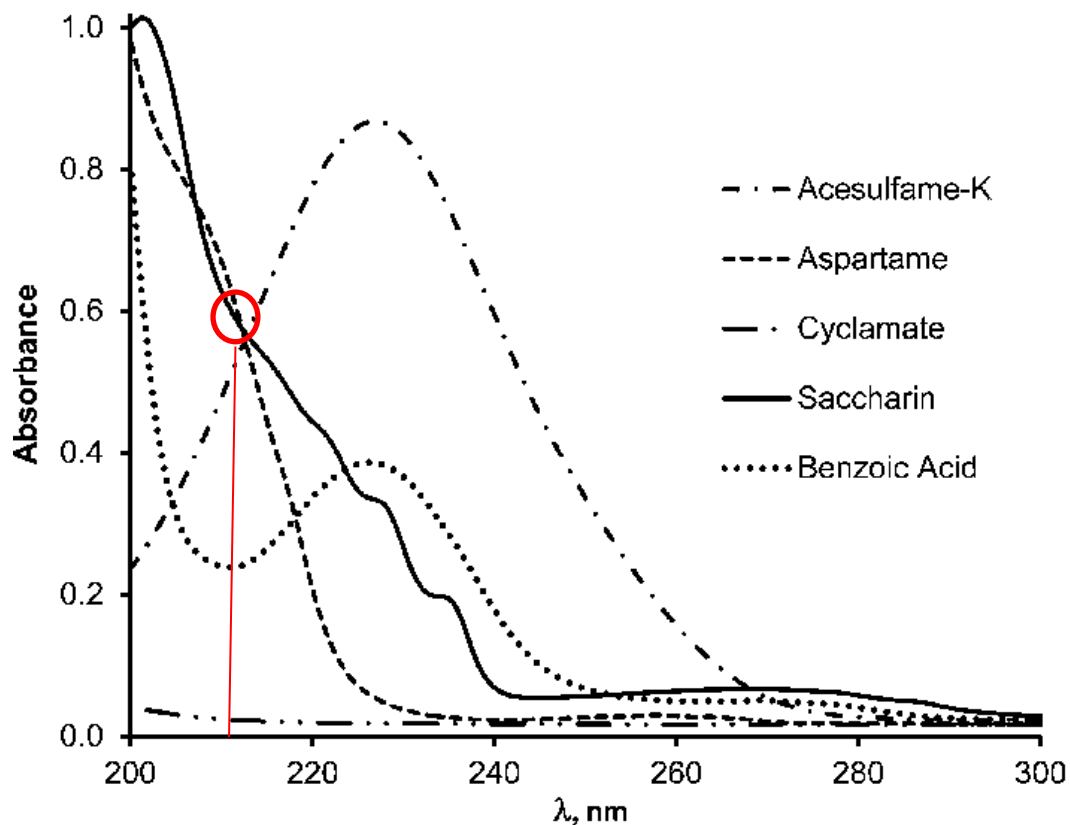


Figure 5 : Spectre UV-Visible de l'aspartame [8]

3. 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&cookie=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/aspartame>

[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>

[8] Spectre UV-Visible consulté sur le site Research Gate le 09/01/2023 : https://www.researchgate.net/figure/Electronic-UV-spectra-of-acesulfame-K-15-mg-L-A1-aspartame-20-mg-L-A1-cyclamate_fig6_235945133