

Optimisation et plans d'expériences en spectrométrie d'absorption atomique : dosage rapide de traces de cuivre dans le beurre

D. Hennequin, C. Lelièvre et D. Barillier

Équipe de Recherche en Physicochimie et Biotechnologies, Institut Universitaire de Technologie, Boulevard Maréchal Juin, 14032 Caen Cedex, France

Traces of copper in emulsified fats are determined directly by atomic absorption spectroscopy with electrothermic atomization (AAS-EA) after dispersion of the sample in a BTA/water/THF (48/12/40) mixture and without previous acidic digestion. The two significant factors of the thermic program: char-ashing ramp (factor $X_1 = 40$ s) and atomization temperature (factor $X_2 = 2450$ °C) were optimized by means of a centered composite plane. A fair agreement is obtained between calibration in a "reconstituted butter" matrix (anhydrous butter oil and water) and calibration in simple medium. The detection limit is about 3 ppb and the sensibility expressed in characteristic mass is about 7 pg/0.0044 U.A. The thermic program is well-suitable for the analysis of butter when increasing the char-ashing temperature to 900 °C. The calibration is carried out in a butter matrix with a detection limit of 7 ppb and sensibility of 17 pg/0.0044 U.A.

Introduction

La présence de métaux, même à l'état de traces, dans les produits alimentaires à teneurs élevées en matières grasses (beurres, margarines, pâtes à tartiner...) peut avoir des conséquences importantes au niveau de la stabilité des produits par accélération de l'auto-oxydation avec des métaux pro-oxydants tels que le cuivre et le fer [1-4] et au niveau de leur toxicité dans le cas du plomb et du cadmium en particulier [4-6].

Les teneurs de ces éléments sont généralement très faibles. Les méthodes actuellement utilisées pour les recherches mettent en œuvre la spectrométrie d'absorption atomique avec atomisation électrothermique (SAA-AE) qui présente l'avantage d'abaisser la limite de détection de la plupart des éléments en évitant la dilution inhérente à l'atomisation en flamme.

Les méthodes officielles [6,7] nécessitent cependant une préparation préalable des échantillons impliquant une minéralisation de l'émulsion alimentaire (beurre, margarine, etc...), opération longue (4-5 heures), fastidieuse, dispendieuse en acides et pouvant conduire à des pertes d'analyte dans le cas d'une minéralisation sèche (cendres).

Dans nos précédents travaux [8,9] nous avons proposé une méthode de solubilisation du beurre qui nous permet d'injecter directement une solution de l'échantillon dans le four de l'appareil, sans calcination préalable. L'avantage de cette méthode est de simplifier considérablement le protocole opératoire de dosage. Son inconvénient réside dans le maintien d'une matrice organique très complexe qui nécessite une correction des perturbations. La recherche du programme thermique le mieux adapté au dosage de l'analyte devient alors une nécessité.

C'est pourquoi l'objectif de cette étude consiste à mettre au point un programme électrothermique de dosage du cuivre en l'état dans les corps gras émulsionnés, après dissolution dans un solvant hydro-organique. L'optimisation du programme devrait permettre de s'affranchir au mieux des effets de matrice. Pour cela il faut éviter les perturbations physiques et chimiques dues aux interférences des éléments minéraux et des molécules organiques de hautes masses moléculaires constitutives des matières grasses laitières et réaliser, si possible, le dosage des échantillons au moyen d'un étalonnage établi en milieu simple. Ce type de dosage, défini par Hoenig et al. [10] comme étant « l'analyse absolue », consiste à comparer valablement un élément contenu dans une matrice complexe en lisant directement la valeur de l'échantillon sur une droite d'étalonnage établie en milieu simple.

La méthodologie des plans d'expériences n'a pas été employée de manière exhaustive pour l'optimisation des programmes thermiques de dosage en SAA-AE mais plutôt, et notamment par Castera et al. [11,12], pour la mise au point ou le choix des paramètres de dosage tels que la longueur d'onde de travail, le type de four, l'utilisation ou non d'une plateforme, le choix de modificateurs chimiques de matrice, ou le choix du système de correction de l'absorption non spécifique. Les programmes thermiques sont généralement établis à partir des courbes de températures optimales de décomposition et d'atomisation.

Le présent mémoire décrit la sélection des paramètres influents du programme thermique de dosage du cuivre par SAA-AE dans les corps gras émulsionnés ainsi que leur optimisation conduite au moyen d'un plan composite centré et des courbes de détermination température optimale de décomposition - température optimale d'atomisation. La mise au point du solvant de dissolution hydro-organique a été réalisée au cours de travaux précédents [8,9].

Partie expérimentale et méthode

Appareillage

Les mesures ont été effectuées soit avec un spectrophotomètre d'absorption atomique Varian AA 1275 équipé d'un atomiseur graphite GTA 95, soit avec un spectrophotomètre Varian AA-100 équipé d'un atomiseur graphite GTA 100 piloté au moyen du logiciel SpectrAA/100/200 sous windows. Les fours utilisés sont des fours à partition recouverts d'une couche de carbone pyrolytique et la verrerie est lavée avec de l'acide nitrique à 10 % bouillant et rincée à l'eau ultrapure.

Réactifs

- Le mélange hydro-organique de dissolution est réalisé à partir de butylamine (BTA) suprapure (Fluka), de tétrahydrofurane (THF) suprapur (Fluka) et d'eau ultrapure obtenue à partir d'une eau distillée par ultrafiltration sur un système milli Q (Millipore).
- La Matière Grasse Laitière Anhydre (MGLA) a été purifiée sur une colonne d'alumine selon Hendrikse et al. [13] afin d'être exempte de métaux.
- Les gammes d'étalonnage ont été réalisées à l'aide de sulfate de cuivre normapur (Prolabo).

Dissolution de l'émulsion grasse

Elle est réalisée selon nos travaux précédents [9] dans des tubes à essai à raison de 1,5 g de matière grasse (1,5 g de beurre ou 1,23 g de MGLA + 0,27 g d'eau) pour 10 g d'un mélange BTA/eau/THF (48/12/40), soit une charge en matière grasse de 15 % dans la solution (m/m).

Conditions analytiques

- L'injection dans le four de l'appareil a été réalisée manuellement à l'aide d'une micropipette pour un volume d'injection de 10 µL.
- Le balayage du four a été réalisé sous argon à un débit de 3L/min.
- Le cuivre a été dosé à la longueur d'onde de 324,8 nm avec une bande passante de 0,5 nm. L'absorption non spécifique a été corrigée au moyen d'une lampe à arc deutérium. La réponse enregistrée est la valeur de l'absorbance mesurée en hauteur de pic sur une moyenne de trois injections (à cause d'un meilleur rapport signal/bruit).

Plans d'expériences

Un programme en SAA-AE comprend trois étapes principales : une étape de séchage du solvant, une étape de minéralisation - destruction de la matrice organique et une étape d'atomisation où se fait la mesure d'absorbance. Ces étapes nécessitent le contrôle de la température, de la durée ainsi que du gradient de montée en température.

La sélection préalable des facteurs influents a été réalisée au moyen d'un plan factoriel à deux niveaux [9] basé sur la mesure de l'absorbance d'un échantillon de beurre reconstitué (82 % de MGLA et 18 % d'eau) et dopé avec 30 ppb de cuivre.

L'analyse de ce plan a conduit à écarter des paramètres non significatifs et à souligner la nécessité d'une étape de séchage classique débutant à 75 °C et d'une étape de décomposition à une température de 600 °C.

Deux paramètres significatifs sont retenus dans le plan d'optimisation : la durée de la montée à la température de minéralisation-décomposition ou rampe de décomposition et la température d'atomisation.

Un plan composite centré a été choisi pour l'optimisation de ces deux facteurs influents.

Résultats et discussion

1. Optimisation du programme thermique

Le programme électrothermique de base est donné dans le tableau I. L'optimisation consiste à déterminer les valeurs optimales de la rampe de décomposition (paramètre X_1) et de la température d'atomisation (paramètre X_2).

L'absorbance ne variant pas de façon linéaire en fonction de ces deux facteurs, il s'agit de déterminer l'optimum des courbes en recherchant le modèle quadratique correspondant. Nous avons donc réalisé un plan composite centré composé de 12 essais : 4 au centre du domaine, 4 en étoile et 4 correspondants au plan 2^2 (Tab. II).

La résolution mathématique de ce modèle conduit à l'équation suivante calculée à l'aide du logiciel Stat Graphics (Uniware) :

$$Y = 0,300 + 0,011 X_1 - 0,003 X_2 + 0,007 X_1 X_2 - 0,001 X_1^2 - 0,020 X_2^2.$$

La surface de réponse associée à ce plan représentée figure 1 permet de fixer la rampe de décomposition et la température d'atomisation au centre du domaine soit respectivement 40 secondes et 2450 °C.

2. Validation de la méthode

Nous avons réalisé deux gammes d'étalonnage, l'une est effectuée en milieu simple, l'autre est effectuée dans une matrice équivalente au beurre à partir de MGLA purifiée exempte de métaux (82 % de MGLA et 18 % d'eau).

L'étalon primaire utilisé est du sulfate de cuivre dans l'eau à 5000 ppm.

Pour l'étalonnage en milieu simple, trois étalons secondaires à 50, 2 puis 0,1 ppm sont réalisés par dilutions successives de l'étalon primaire avec le mélange hydro-organique BTA/eau/THF (48/12/40).

Une gamme d'étalonnage de 0 à 50 ppb est ensuite réalisée selon le tableau III et représentée à la figure 2.

Pour l'étalonnage sur la matrice complexe deux étalons secondaires à 50 puis 0,5 ppm sont réalisés par dilutions successives de l'étalon primaire avec le mélange hydro-organique. Une gamme d'étalonnage de 0 à 50 ppb est ensuite réalisée selon le tableau IV et représentée à la figure 2.

Les mesures d'absorbance données dans les tableaux III et IV sont les moyennes de trois répétitions pour chaque concentration. La corrélation entre les valeurs d'absorbance

Tableau I. Programme thermique de dosage du cuivre.

Numéro étape	Température (°C)	Temps (s)	Débit d'argon (l/min)
1	75	5,0	3,0
2	90	60,0	3,0
3	120	10,0	3,0
4	120	2,0	3,0
5	décomposition Z = 600	rampe de décomposition X ₁ = 20 - 60	3,0
6	Z	3,0	0,0
7	Atomisation X ₂ = 2300 - 2600	1,1	0,0 *
8	X ₂	2,0	0,0 *
9	X ₂	1,0	3,0
10	2700	2,0	3,0
11	40	21,7	3,0

* : mesure d'absorbance.

Tableau II. Optimisation du programme thermique, matrice des essais du plan central composite.

Numéro d'essai	X ₁ : Rampe de décomposition (s)	X ₂ : Température d'atomisation (°C)	Réponse
1	-	-	0,259
2	+	-	0,274
3	-	+	0,252
4	+	+	0,297
5	0	0	0,312
6	0	0	0,273
7	0	0	0,294
8	0	0	0,328
9	- 1,414	0	0,296
10	+ 1,414	0	0,313
11	0	- 1,414	0,284
12	0	+ 1,414	0,255

Niveaux décomposition (s)	Rampe de d'atomisation (°C)	Température
-1,414	20	2300
-1	26	2343
0	40	2450
+1	54	2557
+1,414	60	2600

obtenues selon les deux méthodes est représentée à la figure 3. On observe d'une part la linéarité des étalonnages dans le domaine étudié (Fig. 2) et d'autre part l'absence d'effet de matrice de l'étalonnage réalisé en milieu complexe puisque ce dernier est superposé avec l'étalonnage établi en milieu simple. Ces résultats sont confirmés par la valeur de la pente de la droite de régression (1,028) entre les deux séries d'absorbance de la figure 3, ce qui est tout à fait satisfaisant.

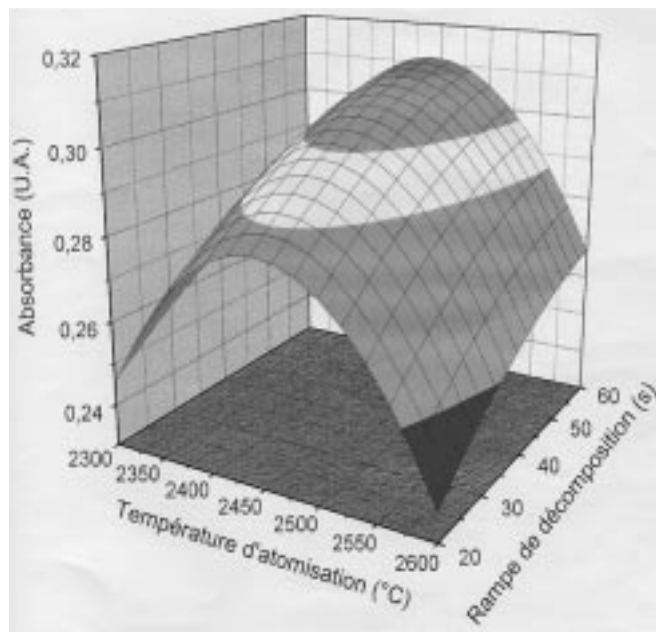


Figure 1. Surface de réponse associée au modèle quadratique.

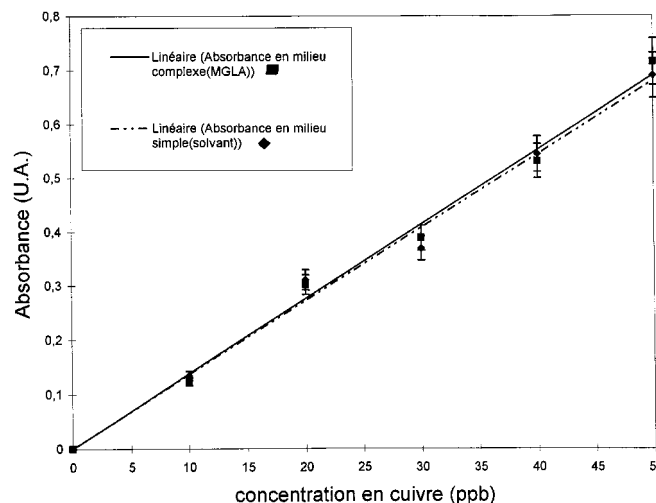


Figure 2. Étalonage en milieu simple (solvant) et en milieu complexe (MGLA).

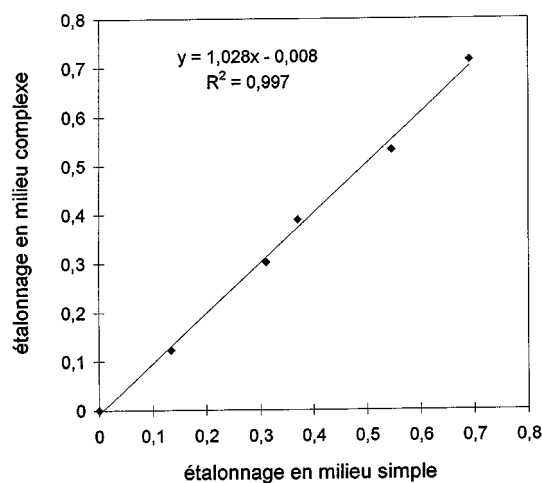


Figure 3. Droite de corrélation entre les valeurs d'absorbance établies en milieu simple (solvant) et en milieu complexe (MGLA).

Tableau III. Étalonnage en milieu simple et résultats en absorbance.

Cuivre en ppb	0	10	20	30	40	50
masse d'étalon à 100 ppb (g)	0	0,500	1,000	1,500	2,000	2,500
solvant q.s.p (g)			5,000			
absorbance	0	0,134	0,311	0,370	0,545	0,690

Tableau IV. Étalonnage sur une matrice reconstituée et résultats en absorbance.

Cuivre en ppb	0	10	20	30	40	50
masse d'étalon à 500 ppb (g)	0	0,200	0,400	0,600	0,800	1,000
MGLA q.s.p . (g)			1,230			
eau q.s.p . (g)			1,500			
solvant q.s.p .(g)			10,000			
absorbance	0	0,123	0,302	0,389	0,532	0,715

faisant compte tenu des très faibles niveaux de concentration impliqués (0 à 50 ppb).

L'optimisation de la programmation thermique ainsi réalisée permet donc d'éliminer les effets de la matrice organique. L'étalonnage en milieu simple semble donc utilisable pour le dosage direct des métaux dans les corps gras émulsionnés selon le principe de « l'analyse absolue » défini précédemment. La limite de détection de la méthode, définie comme la concentration correspondant à trois fois la valeur du bruit de fond [14] est de 3 ppb et la sensibilité, calculée comme la masse d'analyte produisant une absorbance de 0.0044 U.A. pour 10 µL d'échantillon est de 7 pg (masse caractéristique).

3. Dosage dans les émulsions grasses

L'application du programme thermique ainsi établi n'a pas donné entière satisfaction dans le dosage ultérieur des émulsions grasses. Lors du dosage du cuivre dans le beurre, une forte absorption non spécifique demeure au moment de l'atomisation et une fumée résiduelle apparaît. Ces phénomènes suggèrent que la matrice organique n'a pas été totalement détruite lorsque l'on arrive à cette étape.

Ce résultat peut s'expliquer par la différence de composition entre le beurre reconstitué à partir de MGLA et d'eau et le beurre naturel. En effet la MGLA est obtenue par la centrifugation du beurre et l'élimination de la phase aqueuse composée de protéines (2 à 3 %) et de sels minéraux (calcium notamment). Il en résulte une matrice totalement apolaire comportant 99,8 % de lipides, facile à purifier par chromatographie d'adsorption sur silice de manière à obtenir un produit exempt des traces d'ions métalliques à doser, le cuivre dans notre cas. Il est possible d'effectuer alors un étalonnage direct sur la matrice et d'éviter la méthode fastidieuse de l'étalonnage par ajouts dosés. Cependant la matrice n'étant pas totalement identique à celle du beurre, il s'avère que le programme thermique mis au point avec la MGLA n'est pas parfaitement adapté au dosage du beurre. Les protéines et les sels minéraux ne sont pas totalement éliminés à la température de décomposition choisie

(600 °C). Nous avons voulu vérifier cette hypothèse et comparer le comportement d'un « beurre reconstitué » et d'un véritable beurre en déterminant les températures optimales de décomposition et d'atomisation.

4. Détermination des températures optimales de décomposition et d'atomisation

Deux échantillons ont été préparés contenant une charge de 1,5 g de matière grasse pour 10 g de solvant hydro-organique : l'un est obtenu à partir de MGLA et d'eau (1,23 g de MGLA et 0,27 g d'eau) et l'autre à partir d'un beurre (choisi pour sa faible concentration en cuivre). Chaque échantillon est dopé avec une charge de 60 ppb en cuivre, l'échantillon non dopé servant à la mise à zéro de l'appareil.

En gardant les conditions analytiques décrites précédemment et notamment la base du programme thermique établi au tableau I, nous avons déterminé les courbes absorbance-température représentées à la figure 4. Les températures optimales de décomposition respectives sont obtenues en reprenant la température d'atomisation du programme déjà utilisée (2450 °C). Les températures optimales d'atomisation sont ensuite déterminées en utilisant les températures optimales de décomposition, soit 600 °C pour le beurre reconstitué et 900 °C pour le beurre véritable.

L'observation des courbes représentées à la figure 4 vérifie notre hypothèse et ne remet pas en cause l'optimisation effectuée au moyen des plans d'expériences : les conditions optimales d'atomisation sont vérifiées dans les deux cas à 2450 °C. La température optimale de minéralisation est cependant variable d'une matrice à l'autre et doit être fixée à 900 °C dans le cas du beurre.

Le beurre ne peut être purifié de ses traces métalliques comme la MGLA. L'étalonnage a donc été réalisé comme indiqué dans le tableau V, selon une calibration du type ajouts dosés, à partir d'un beurre choisi pour son faible taux de cuivre et dopé de 0 à 50 ppb en cuivre. Cet étalonnage, ainsi que l'étalonnage en milieu simple, ont été effectués en

Tableau V. Étalonnage sur une matrice de beurre et résultats en absorbance.

Cuivre en ppb	0	10	20	30	40	50
masse d'étalon à 500 ppb (g)	0	0,200	0,400	0,600	0,800	1,000
beurre (g)			1,500			
solvant q.s.p. (g)			10,000			
absorbance	0,094	0,153	0,203	0,253	0,303	0,386

appliquant le programme thermique du tableau I avec une température de décomposition fixée à 900 °C, une rampe de décomposition de 40 s et une température d'atomisation de 2450 °C (Fig. 5).

On peut observer que les pentes des deux courbes sont sensiblement différentes ce qui montre que nos conditions de travail ne nous permettent pas de nous affranchir totalement des effets de matrice et n'autorisent pas la lecture directe comme dans le cas du beurre reconstitué. Cependant on peut déduire par translation à l'origine de la droite d'étalonnage en milieu complexe, une droite de calibration unique. Celle-ci est utilisable quel que soit l'échantillon. On évite ainsi l'application systématique de la méthode des ajouts dosés à chaque échantillon de beurre, en postulant que les différences de matrices sont négligeables d'un beurre à l'autre et à condition d'étalonner avec une matrice de concentration très faible en cuivre. La limite de détection de la méthode pour le dosage du beurre est alors de 7 ppb et la sensibilité de 17 pg/0.0044 U.A.

Conclusion

Notre travail montre que la méthodologie des plans d'expériences peut être utilisée avec succès pour l'optimisation d'un programme thermique en SAA-AE. Elle nous a permis, à partir d'une matrice de MGLA, d'établir un programme de base autorisant le dosage direct de résidus de cuivre dans une matière grasse dissoute dans un solvant hydro-organique selon le principe de « l'analyse absolue ».

Ce programme modèle a pu être adapté au dosage du beurre par modification d'un seul paramètre. En effet un faible changement dans la nature de la matrice organique peut fortement perturber les conditions de pyrolyse ce qui nous a conduit à modifier la température de décomposition sans altérer le programme thermique établi. On peut alors recourir à la courbe classique d'optimisation de la température de décomposition en complément du plan de base établi par la méthodologie des plans d'expériences. Ce modèle doit permettre de généraliser le dosage de traces de cuivre à d'autres émulsions grasses : beurres allégés, pâtes à tartiner, margarines, etc.

Enfin nous avons mis au point une méthode de dosage de traces de cuivre dans les émulsions grasses, par solubilisation directe de l'échantillon, évitant la longue et difficile étape de minéralisation classiquement employée, et permettant d'atteindre un seuil de détection très satisfaisant de l'ordre de 3 ppb.

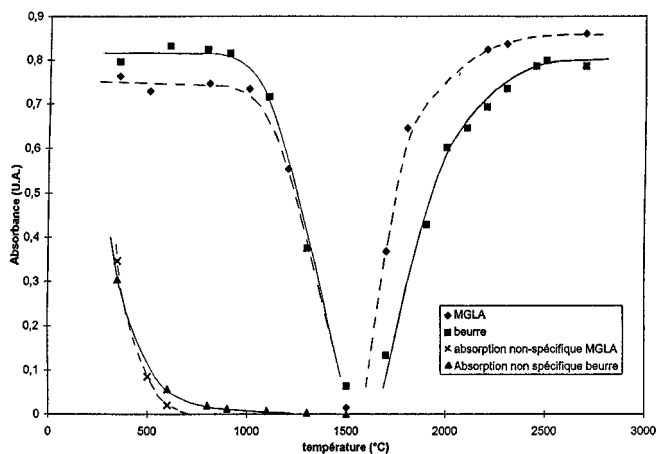


Figure 4. Détermination des températures optimales de minéralisation et d'atomisation, et fond continu généré par un échantillon de MGLA ou de beurre dopés à 60 ppb de cuivre.

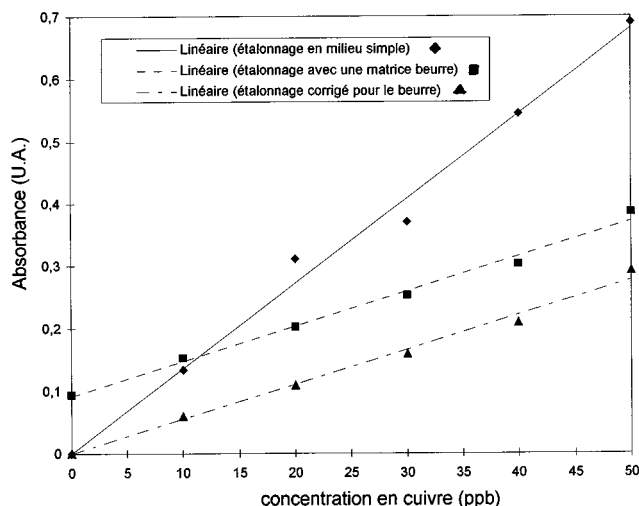


Figure 5. Étalonnage pour la détermination du cuivre établi en milieu simple et sur une matrice mélangée réalisée avec du beurre.

Références

1. Hasse, G.; Dunkley, W. L. *Milchwissenschaft* **1970**, *25*, 656-661.
2. Ford, J. E.; Schröder, M. J. A.; Bland, M. A. *J. Dairy Res.* **1986**, *53*, 391-406.
3. Mertens, W. G.; Swindells, C. E.; Teasdale, B. F. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1971**, *48*, 544.

4. List, G. R.; Evans, C. D.; Kwolex, W. F. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1971**, *48*, 438.
 5. FAO/WAO, rapport of the joint FAO-WAO, expert committee in food additives, Food nutritive meetings report series, 1972, 51, Who.
 6. Hendrikse, P. W.; Slikkerveer, F. J.; Folkersma, A.; Dieffenbacher, A. *Pure Appl. Chem.* **1991**, *63*, 1183-90.
 7. Official methods of analysis of the association of official analytical chemists, 13th edition, 1980, Horwitz W. Ed., New-York, p 398.
 8. Dorey, F.; Barillier, D.; Bosque, F.; Paraire, V.; Le Querler, J. F. *Analisis* **1993**, *21*, 49-52.
 9. Lelievre, C.; Hennequin, D.; Barillier, D.; Lemasson, F. *Analisis* **1996**, *24*, 39-42.
 10. Hoenig, M.; De Kersabiec, A. M. L'atomisation électrothermique en spectrométrie d'absorption atomique, Masson, Paris, 1990; p 131.
 11. Castera, A.; Lacoste, F.; Lespagne, J. *Analisis* **1992**, *20*, 19-28.
 12. Lacoste, F.; Castera, A.; Lespagne, J. *Rev. Fr. Corps gras* **1993**, 19-31.
 13. Hendrikse, P. W.; Slikkerveer, F. J.; Zaaberg, J.; Hautfenne, A. *Pure Appl. Chem.* **1988**, *60*, 893-900.
 14. Analytical methods committee of the Royal Society of Chemistry *Analyst* **1987**, *112*, 199-204.
-