

Analyse quantitative rapide des glucosinolates du colza par chromatographie en phase liquide isocratique

Alain QUINSAC et Daniel RIBAILLIER

CETIOM - Laboratoire d'analyses, Avenue de la Pomme de Pin, 45160 - Ardon FRANCE

INTRODUCTION

Depuis 20 ans, l'analyse des glucosinolates (GSL) (tableau 1) a fait l'objet de nombreuses recherches. Les méthodes d'analyse globale sont appréciées pour leur rapidité et leur faible coût, mais l'apparition des variétés de colza à faible ou très faible teneur en GSL et contenant une proportion en indolyGSL importante, a montré l'intérêt que présente la chromatographie en phase liquide (CPL) pour le dosage individuel ou global de ces composés.

La méthode d'analyse de référence normalisée par la Commission des Communautés Européennes et l'International Standard Organization met en oeuvre la CPL avec gradient d'élution des dérivés désulfatés des glucosinolates (DSGSL) (CCE, 1990). Malgré de nombreux tests interlaboratoires qui ont démontré la fiabilité et les performances de cette méthode pour les analyses de graines de colza (Buchner, 1987 ; Ribaillier et Quinsac, 1991 ; Wathelet et al., 1987, 1991) celle-ci reste peu employée pour les analyses de routine à cause du coût du matériel nécessaire et de la faible cadence des analyses réalisées.

Tout en conservant le mode de préparation des DSGSL, nous avons modifié le processus chromatographique de la méthode de référence afin d'utiliser un appareillage plus simple, moins coûteux, et aboutir à des analyses rapides et fiables des graines de colza. Nous avons envisagé un mode d'élution isocratique, économique en temps et en matériel, puis testé plusieurs phases stationnaires en silice greffée cyanopropyle et des phases mobiles très riches en eau. Les sélectivités de séparation des DSGSL du colza sont étudiées en vue de proposer le système le mieux adapté. Les performances de la nouvelle méthode sont évaluées par rapport à la méthode de référence avec élution par gradient en vue de disposer d'une méthode rapide alternative.

Tableau 1

Les glucosinolates du colza

Chaîne latérale	Glucosinolates	GSL	DSGSL
prop-2-ényl*	sinigrine	SIN	DSSIN
but-3-ényl	gluconapine	GNA	DSGNA
pent-4-ényl	glucobrassicinapine	GBN	DSGBN
2-hydroxybut-3-ényl	progoitrine	PRO	DSPRO
2-hydroxypent-4-ényl	gluconapoléiférine	GNL	DSGNL
benzyl*	glucotropaéoline	GTL	DSGTL
2-phényléthyl	gluconasturtine	GST	DSGST
4-hydroxybenzyl	sinalbine	SNB	DSSNB
indol-3-ylméthyl	glucobrassicine	GBS	DSGBS
4-hydroxyindol-3-ylméthyl	4-hydroxyglucobrassicine	4OHGBS	DS4OHGBS
4-méthoxyindol-3-ylméthyl	4-méthoxyglucobrassicine	4OMGBS	DS4OMGBS
1-méthoxyindol-3-ylméthyl	néo-glucobrassicine	NGBS	DSNGBS

* GLS absent du colza et utilisé comme étalon interne dans les analyses chromatographiques

MATERIEL ET METHODES

- Le matériel, les produits et le protocole pour la préparation des DSGSL sont décrits dans la méthode de référence (CCE, 1990). L'étalon interne utilisé est la glucotropaéoline.
- Appareillage CPL : pompe type 64 (Knauer, Berlin, Allemagne) ; vanne d'injection modèle 7125 (Rhéodyne Inc, Cotati, U.E.) avec boucle de 20 μ l ; four à colonne Crococol (Cluzeau-Info-Labo, Ste Foy-la-Grande, France) ; détecteur UV à balayage de spectres Focus et logiciel d'exploitation des données Spectra-Station (Spectra-Physics, San-José, E.U.)
- Colonnes CPL : Lichrospher CN 5 μ m 250 x 4 mm (Merck, Darmstadt, Allemagne) ; Adsorbospher CN-AQ 5 μ m 250 x 4,6 mm (Alltech Associates, Deerfield, E.U.) ; Hypersil CN 5 μ m 250 x 4,6 mm, Nucleosil CN 5 μ m 250 x 4,6 mm (Interchim, Montluçon, France)
- Produits pour CPL : eau déminéralisée, acétonitrile, méthanol, qualité CPL. Les éluants pour CPL sont filtrés à 0,22 μ m
- Analyse des DSGSL : élution en mode isocratique à température ambiante avec un débit de 1 ml.min⁻¹. Le choix de la nature de l'éluant est lié à la nature de la colonne (tableau 2). La détection est réalisée par spectrophotométrie UV à 229 nm. Les coefficients de réponse utilisés pour le calcul des teneurs des différents GSL proviennent de la méthode de référence (CCE, 1990)

RESULTATS ET DISCUSSION

1 - Choix des phases stationnaires et mobiles

Les phases stationnaires en silice greffée n-alkyle (C_8 , C_{18}) utilisées habituellement avec des éluants riches en eau, pour la séparation des DSGSL, se caractérisent par un pouvoir de rétention élevé pour les indolyDSGSL, et par une sélectivité importante entre les DSGSL de polarités différentes tels que, par exemple, la DSPRO et la DS_nGBS. Les séparations doivent donc être réalisées en gradient d'élution.

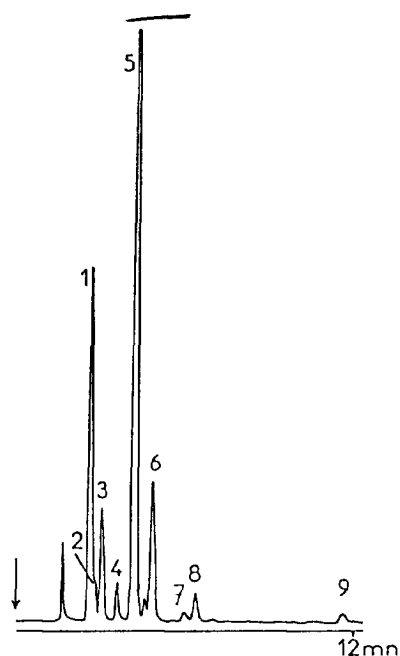


Figure 1 : Chromatogramme de DSGSL du colza

Colonne Lichrospher CN 250 x 4 mm. Eluant H_2O 1 ml.min⁻¹, 25°C

Identification des pics : 1 : DSPRO ; 2 : DSGNL ; 3 : DSGNA ; 4 : DSGBN ; 5 : DSGTL ;
6 : DS4OHGBS ; 7 : DSGST ; 8 : DSGBS ; 9 : DS_nGBS

En revanche, les silices greffées CN présentent des rétentions et des sélectivités plus faibles et permettent l'utilisation d'un mode d'élution isocratique. Des travaux ont montré qu'une analyse rapide (moins de 12 min) était possible en utilisant l'eau pure comme éluant (figure 1) (Quinsac et al., 1991). Cependant, il existe entre les diverses phases stationnaires CN mises sur le marché, de grandes différences de comportement. Nous avons testé quelques unes d'entre elles et précisé les meilleures conditions d'utilisation pour l'analyse rapide des DSGSL du colza. Le tableau 2 montre les facteurs de capacité mesurés avec des éluants choisis pour que le temps de rétention (T_r) du dernier DSGSL élué soit inférieur à 20 min.

Tableau 2

Facteurs de capacités k' et temps d'analyse T_r de solutions de DSGSL du colza sur quelques systèmes phase stationnaire-éluant

Température : 25 C, débit 1 ml/min

Caractéristiques des colonnes : voir matériel et méthodes

Colonne	Éluant	k'						T_r
		DSPRO	DSGNA	DSGTL	DS40MGBS	DSGBS	DSnGBS	
Lichrospher n 4 (a)	H ₂ O	1,35	1,72	2,50	3,01	3,96	8,30	11,1
Adsorbosphere	H ₂ O	1,02	1,22	1,39	1,98	2,60	4,65	9,0
Lichrospher n 5 (a)	MeOH 10%	1,20	1,60	2,57	3,10	4,29	7,94	10,6
	ACN 5%	1,24	1,68	2,73	3,24	4,56	8,38	11,2
Hypersil	MeOH 20%	1,31	1,71	2,47	3,03	4,04	6,84	11,0
	ACN 10%	1,31	1,79	2,79	3,13	4,52	8,26	13,0
Nucleosil	MeOH 20%	1,33	1,72	2,46	2,93	3,91	6,56	12,1
	MeOH 10% (b)	1,12	1,61	2,67	3,53	4,97	9,60	17,0
	ACN 10%	1,02	1,44	2,26	2,51	3,66	6,74	12,4

(a) colonnes de même marque mais achetées à des dates différentes

(b) conditions pour une séparation meilleure mais plus longue

Les DSGSL majoritaires dans le colza étant toujours bien séparés (figure 1), il est donc possible, même avec la méthode la plus rapide (moins de 10 minutes), d'obtenir des résultats quantitatifs précis. Une séparation plus fine des DSGSL minoritaires peut être réalisée en choisissant un système plus résolutif mais moins rapide (tableau 2).

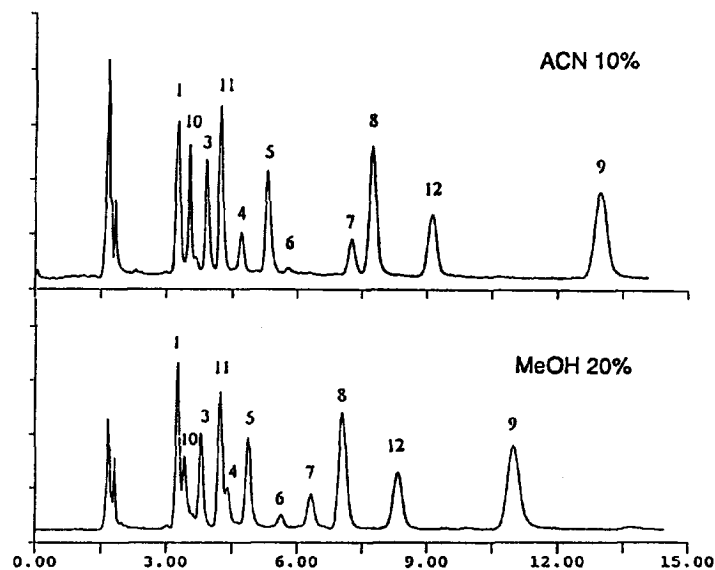


Figure 2 : Chromatogramme de DSGSL (solution standard)

Colonne Hypersil CN 250 x 4,6 mm 25°C
Éluant : 1 ml.min⁻¹ a - eau acétonitrile (90-10)
b - eau méthanol (80-20)

Identification des pics : 1 à 9 : voir figure 1 ; 10 : DSSIN ; 11 : DSSNB ;
12 : DS40MGBS

L'utilisation des phases CN de polarité moyenne apporte des sélectivités nouvelles. La séparation DSGSL, DS4OMGBS difficile avec une phase alkyle est aisée avec une phase CN (figure 2). Malgré les différences importantes observées avec les facteurs de capacité des DSGSL sur plusieurs phases CN, les ordres d'éluion sont presque toujours les mêmes et les séparations mises au point avec une marque de phase stationnaire peuvent être facilement reproduites en adaptant la phase mobile. Le tableau 2 montre que les colonnes Lichrospher CN n° 4 et n° 5 donnent des résultats similaires si l'une est utilisée avec de l'eau et l'autre avec un mélange eau-méthanol (90-10). L'amélioration d'une séparation pourra être réalisée par l'emploi d'un solvant organique tel que le méthanol ou l'acétonitrile. En effet, avec ces deux solvants les sélectivités diffèrent d'une manière plus importante sur une phase CN (figure 2) que sur une phase n-alkyle.

L'analyse de DSGSL provenant d'autres crucifères est également envisageable avec une phase CN dès lors que la sélectivité recherchée est obtenue par le choix approprié des phases stationnaires et mobiles (tableau 2).

2 - Analyse quantitative

La bonne séparation des DSGSL et en particulier de l'étalon interne étant nécessaire à l'obtention de résultats quantitatifs corrects, la sinigrine doit être remplacée par la glucotropaéoline pour l'étalonnage interne.

La comparaison de la méthode isocratique et de la méthode par gradient est réalisée en analysant 12 échantillons de graines de colza dont les teneurs sont comprises entre 9 et 75 $\mu\text{mol/g}$. La comparaison n'a porté que sur l'analyse par CPL, la préparation des solutions de DSGSL étant commune aux deux méthodes. La figure 3 illustre la très bonne correspondance entre les résultats globaux donnés par les 2 méthodes sur toute la gamme des échantillons. Les teneurs des GSL individuels sont également parfaitement corrélées et le coefficient de régression est très proche de 1 (tableau 3). Ces résultats montrent que le mode d'éluion n'influe pas significativement sur les coefficients de réponse relatifs des DSGSL.

Tableau 3

Comparaison des résultats obtenus sur une gamme de 12 échantillons de graines de colza par la méthode isocratique (a) et par la méthode avec gradient d'éluion (méthode de référence) (b)

GSL	Corrélation r ²	Coefficient de régression	écart type résiduel
PRO	0,9965	1,046	0,772
GNA	0,9997	0,982	0,068
GBN	0,9976	0,990	0,075
4-OHGBS	0,9716	1,055	0,085
GSL totaux	0,9988	0,996	0,647

(a) colonne Lichrospher CN 250x4 mm ; éluant : eau pure

(b) colonne Lichrospher RP8 125x4 mm ; éluant : gradient eau-acétonitrile

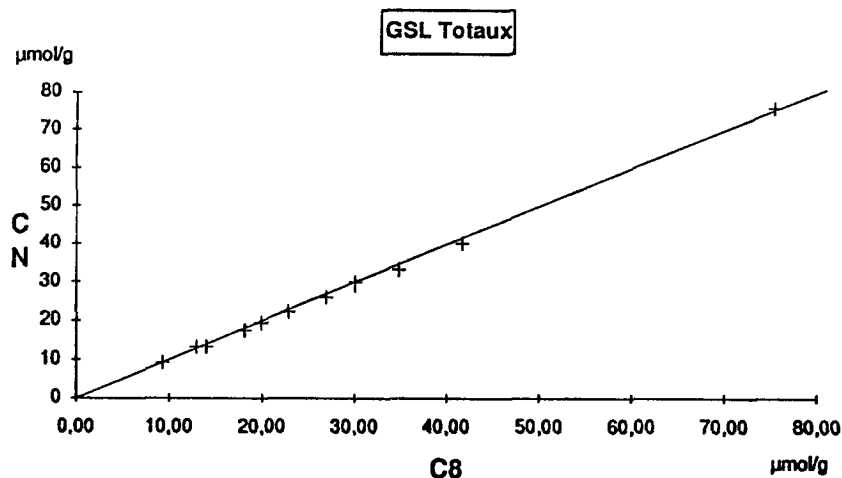


Figure 3 : Résultats d'analyse des GSL totaux de 12 échantillons de colza obtenus par la méthode isocratique (CN) et par la méthode de référence (C8)

Conditions : voir tableau 3

Des essais d'analyse de colza pollué par des graines contenant de la sinigrine et de la sinalbine ont également été réalisés. Ces deux GSL ont des dérivés désulfatés très mal séparés lors des analyses en mode isocratique rapide. Cependant, les DSGSL voisins ayant des coefficients de réponse similaires, l'erreur sur la teneur globale de l'échantillon est minimale comme l'indique le tableau 4. En revanche, les teneurs individuelles des DSGSL mal séparés sont dans ce cas imprécises.

Tableau 4

Résultats comparés de l'analyse globale des glucosinolates par les méthodes CPL isocratique et gradient dans 4 échantillons de colza commerciaux pollués (A et B) ou non pollués (C et D) par des crucifères adventices

Méthode CPL		Echantillon			
		colza pollué (a)		colza non pollué	
		A	B	C	D
isocratique	moyenne (b)	27,1	46,1	19,0	36,6
	écart-type (b)	0,1	0,8	0,2	0,4
gradient	moyenne (b)	27,9	46,1	19,0	36,5
	écart-type (b)	0,9	1,3	0,9	1,0

(a) présence de sinigrine et de sinalbine provenant d'impuretés

(b) calculé avec 5 déterminations

Les résultats globaux satisfaisants obtenus avec la méthode isocratique, même avec une séparation insuffisante de certains DSGSL, s'expliquent par la très bonne séparation existant entre ces groupes de pics mal résolus, l'étalon interne (DSGTL) et les indolylDSGSL qui ont des coefficients de réponse très différents. L'étude de répétabilité effectuée pendant cet essai (tableau 4) montre des résultats meilleurs pour la méthode isocratique. Ceux-ci sont dus principalement à la stabilité très grande du système chromatographique (débit, ligne de base) avec ce mode d'élution.

3 - Intérêt de la méthode

Lorsque l'élution isocratique est possible pour résoudre un problème de séparation, son emploi ne comporte que des avantages. L'analyse est généralement plus rapide (dans le cas des analyses des DSGSL du colza, la durée est ramenée de 25 min à 12 min) ; le matériel est considérablement plus simple, moins onéreux à l'achat et à l'entretien et les éluants utilisés peuvent être d'une qualité moindre. L'eau et l'acétonitrile exigés pour la méthode d'élution par gradient doivent être de haute qualité pour éviter les pics fantômes et les dérives de ligne de base (le méthanol, peu transparent en UV est proscrit). La méthode isocratique se satisfait de solvant de qualité moyenne qui peut être recyclé dans le réservoir après la sortie du détecteur. Enfin, il est possible d'opter pour une élution par l'eau pure et d'éviter ainsi le rejet de solvant polluant.

Les avantages de la méthode isocratique décrits ci-dessus ne seront effectifs que si l'utilisateur trouve dans les choix des phases et des conditions d'élution la solution de ses problèmes de séparation. Pour cela, il est nécessaire de lui proposer un éventail de phases stationnaires largement disponibles, aux propriétés variées, aux caractéristiques connues et stables dans le temps. Dans ce but, une collaboration entre laboratoires de plusieurs pays est souhaitable.

CONCLUSION

Par l'utilisation des phases stationnaires CN plus polaires que les silices n-alkyles, la méthode proposée offre le moyen de réaliser en routine des analyses de GSL du colza, simples, rapides, peu coûteuses et non polluantes.

La très bonne correspondance avec les résultats de la méthode de référence, observée dans ce travail doit être confirmée par des tests interlaboratoires. Une étude comparée de disponibilité et de performances de plusieurs phases CN doit également être menée dans le même cadre. Sur la base des travaux présentés, la méthode par CPL isocratique pourrait donc être normalisée en tant que méthode rapide en complément de la méthode de référence avec élution par gradient.

REFERENCES

BUCHNER, R., 1987. Results of the First European Ring Test for HPLC Analysis of Glucosinolates in Rapeseed. *In Final Report on the EEC Research Project Contract nr. 4212*, 9 p.

C.C.E. Commission des Communautés Européennes, 1990. *Règlement (CEE) N° 1864/90 du 29 juin 1990, Annexe VIII, J.O. n° L170, 27-34.*

QUINSAC, A., RIBAILLIER, D., ELFAKIR, C., LAFOSSE, M. and DREUX, M., 1991. A New Approach to the Study of Glucosinolates by Isocratic Liquid Chromatography. Part I. Rapid Determination of Desulfated Derivatives of Rapeseed Glucosinolates. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 74, 932-939.

RIBAILLIER, D. et QUINSAC, A., 1991. Differentes méthodes de dosage des glucosinolates. Quelques résultats comparatifs. *Bulletin GCIRC, Paris*, 6, 108-114.

WATHELET, J-P., BISTON, R., MARLIER, M. and SEVERIN, M., 1987. Analysis of individual glucosinolates in rapeseeds. Comparison between different methods. *In World Crops : Production, Utilization, Description, Ed. Wathelet, J-P., Martinus Nijhoff, Dordrecht*, 13, 109-124.

WATHELET, J-P., QUINSAC A., MARLIER, M., SEVERIN, D., RIBAILLIER, D. and WAGSTAFFE, P.J., 1991. Collaborative studies organized by ISO and the Community Bureau of Reference (BCR-CEE) to improve analytical methods concerning glucosinolates in rapeseed. *Rapeseed Cong. 8th, Saskatoon, Eds. GCIRC, Canola Council of Canada*, 4, 1294-1299.