

L'Analyse des glucosinolates, travaux réalisés par l'Organisation internationale de standardisation et la CCE

Jean-Paul WATHELET *, Daniel RIBAILLIER **, M. SEVERIN * et Alain QUINSAC **

* U.E.R. Chimie générale et organique,
Faculté des Sciences agronomiques de Gembloux B-5030-Gembloux Belgique

** Laboratoire du CETIOM, Avenue de la Pomme de Pin F-45160-Olivet Ardon

INTRODUCTION

Mis en évidence le siècle dernier, les glucosinolates se rencontrent principalement dans l'ordre des Capparales constitué des Capparaceae, Cruciferae, Moringaceae, Resedaceae et Tovariaceae. Ils ont aussi été identifiés dans d'autres familles comme les Cariaceae, Euphorbiaceae, Gyrostemonaceae, Limnaceae, Salvadoraceae et Tropaeolaceae.

Les glucosinolates et leurs produits de dégradation obtenus sous l'action d'une enzyme appelée myrosinase sont physiologiquement actifs.

Dans le domaine de l'alimentation humaine, ils contribuent notamment à la saveur de différentes plantes comme les choux, le radis, le cresson, le rutabaga, le raifort, la moutarde, les brocolis ...

Initialement présents dans le parenchyme des graines de colza, ils subsistent dans les tourteaux obtenus après extraction de l'huile et provoquent des effets toxiques chez les animaux. Ceci limite l'utilisation des tourteaux de colza en particulier pour les animaux à croissance rapide comme le porc et les volailles. C'est pourquoi la CCE, soucieuse de promouvoir la culture de colza en Europe, a encouragé à un moment donné les agriculteurs à cultiver des colzas à faible teneur en glucosinolates en accordant des primes.

Les aspects économiques sont donc très importants et disposer d'une méthode de dosage des glucosinolates fiable est donc une préoccupation d'un grand nombre de personnes (nutritionnistes, sélectionneurs, agriculteurs, organismes stockeurs, industriels huiliers et fabricants d'aliments pour le bétail).

L'objet de cet article est de présenter les travaux réalisés dans ce domaine par l'ISO et la CCE (DG VI et DG XII -BCR) depuis 1984.

STRUCTURE ET METHODES DE DOSAGE DES GLUCOSINOLATES

Environ 100 glucosinolates (GLS) ont été identifiés à ce jour dans le règne végétal. Une dizaine d'entre eux se retrouvent généralement dans les graines de colza d'hiver et diffèrent par la nature du radical R (Tableau 1).

Par action d'une enzyme (myrosinase) et suivant les conditions opératoires ils sont rapidement transformés en isothiocyanates, oxazolidine thiones, nitriles, thiocyanates, amines, épithionitriles, glucose et sulphate.

Les méthodes développées depuis plusieurs années (tableau 2) pour doser les glucosinolates se basent sur:

- a) une mesure des produits de dégradation
- b) un dosage des glucosinolates désulfatés et silylés
- c) une séparation des glucosinolates intacts
- d) des méthodes indirectes comme la fluorescence aux rayons X ou la spectrométrie dans le proche infra-rouge (NIR).

TRAVAUX REALISES PAR L'ORGANISATION INTERNATIONALE DE STANDARDISATION (ISO)

Le sous comité TC34/SC2 de l'organisation internationale de standardisation s'occupe activement de la normalisation des méthodes concernant les glucosinolates. De nombreuses analyses circulaires ont été organisées depuis plusieurs années et les résultats analysés par des panels d'experts internationaux .

Le tableau 3 montre l'évolution des différentes analyses circulaires réalisées par l'ISO depuis 1984.

Les tableaux 4 et 5 comparent la répétabilité, la reproductibilité et les moyennes observées par les différentes méthodes testées.

Les résultats obtenus en 1986 indiquent que la répétabilité est bonne pour la méthode par chromatographie en phase gazeuse mais nettement plus élevée pour la méthode au palladium. La méthode au glucose donne des moyennes élevées ce qui peut être dû au glucose libre. La méthode par chromatographie en phase gazeuse avec programmation de température donne les meilleurs résultats de reproductibilité.

En 1988, la CLHP est introduite et présente une bonne répétabilité. La fluorescence aux rayons X donne une répétabilité élevée pour l'échantillon C dont la teneur en glucosinolates est faible. Les moyennes observées par la méthode au thymol sont nettement plus élevées . Il en est de même par fluorescence aux rayons X pour l'échantillon B. Cette teneur élevée peut être provoquée par une dégradation des glucosinolates en produits soufrés non dosés par CLHP ou par une teneur supérieure en protéines. La reproductibilité du test au thymol n'est pas excellente.

En 1990, la répétabilité de la méthode CHLP est améliorée. La sinigrine utilisée comme étalon interne donne une meilleure répétabilité et reproductibilité. L'utilisation de la glucotropaéoline augmente légèrement la moyenne. La fluorescence aux rayons X donne d'excellents résultats .Il faut toutefois noter que trois matériaux à teneur certifiée en soufre par le Bureau Communautaire de Référence (BCR-CCE) avait été distribués aux différents laboratoires pour calibrer leur appareil.

Lors de sa dernière réunion, à Winnipeg en 1991, l'ISO a décidé de poursuivre la normalisation de deux méthodes de dosage des glucosinolates dans les graines :

- une méthode CLHP (désulfoglucosinolates) de référence
- une méthode très rapide par fluorescence au rayons X.

La méthode CLHP a été officiellement publiée par l'ISO en juin 1992 (ISO 9167-1), elle est similaire à la méthode officielle de la CCE (N° L 170/27, 03/07/90) et fait l'objet d'une procédure PQ (procédure de mise à jour rapide) au niveau du CEN (Comité Européen de Normalisation).

Une méthode CLHP pour doser les glucosinolates dans les tourteaux vient d'être également testée fin 1992. Les résultats très récents et non publiés à ce jour sont repris dans le tableau 6. Les répétabilités et reproductibilités observées sont excellentes. Les coefficients de variation les plus élevés sont obtenus pour la 4 OH glucobrassicine.

Les travaux de ce sous comité ont été réalisés en étroite collaboration avec la CCE (DG VI et BCR).

TRAVAUX REALISES PAR LA CCE (DG VI et DG XII)

au niveau de la DG VI

De nombreuses réunions d'experts ont été organisées par la DG VI afin de mettre au point les méthodes de dosage des glucosinolates (CPG et CLHP).

Dès 1986, six laboratoires participèrent activement à l'élaboration de la méthode officielle de dosage des désulfoglucosinolates par CLHP : CETIOM, France; Université de Gottingen, Allemagne; Université de Copenhague, Danemark; Rikilt, Hollande; Food Research Institute, Angleterre et la Faculté de Gembloux, Belgique)

au niveau de la DG XII

En étroite collaboration avec la DG VI et l'ISO, le Bureau Communautaire de référence (BCR) a lancé, en 1986, un vaste programme d'analyses circulaires et de préparation de matériaux certifiés afin d'aider les laboratoires en leur permettant de mieux contrôler leur méthode et de calibrer leurs appareils (par exemple l'appareil aux rayons X)

a) intercomparaisons

A titre d'exemple, la figure 1 montre les résultats obtenus lors d'une intercomparaison de méthodes organisée par le BCR. On constate que la fluorescence aux rayons X est une méthode dont la répétabilité et la reproductibilité sont excellentes. La CLHP des désulfoglucosinolates donne également de bons résultats.

b) matériaux de référence

Après avoir étudié et confirmé la stabilité des glucosinolates dans les graines de colza, le BCR a préparé trois matériaux de référence (graines de colza) à teneur certifiée en glucosinolates totaux et en soufre (Tableau 7). Chaque certification a été réalisée par plusieurs laboratoires européens et par différentes méthodes.

Le BCR envisage également de certifier des extraits de désulfoglucosinolates ou de glucosinolates.

CONCLUSIONS

De nombreuses méthodes de dosage des glucosinolates ont été développées ces dix dernières années.

Le chimiste dispose donc actuellement d'un arsenal très complet de méthodes depuis des tests très rapides mais peu précis jusqu'à des méthodes plus longues à mettre en oeuvre.

Depuis 1984, de nombreux travaux ont été réalisés en étroite collaboration entre l'ISO et la CCE pour améliorer les méthodes et préparer des matériaux de référence.

Le CEN (Comité Européen de Normalisation) a créé, en 1993, un sous-comité qui travaillera également en relation avec l'ISO et la CCE.

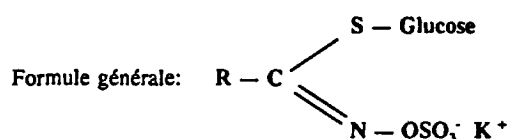
En ce qui concerne le contrôle commercial des graines, le choix semble fait aussi bien au niveau européen (CCE) qu'international (ISO) pour retenir:

- une méthode de référence dosant tous les glucosinolates avec précision (CHLP des glucosinolates désulfatés).
- une méthode rapide, fiable, mais indirecte donnant la valeur totale en glucosinolates (fluorescence aux rayons X).

Pour d'autres contrôles, selon ses besoins, chaque utilisateur pourra utiliser une technique en rapport avec ses exigences (rapidité, simplicité, précision) et ses possibilités d'investissement.

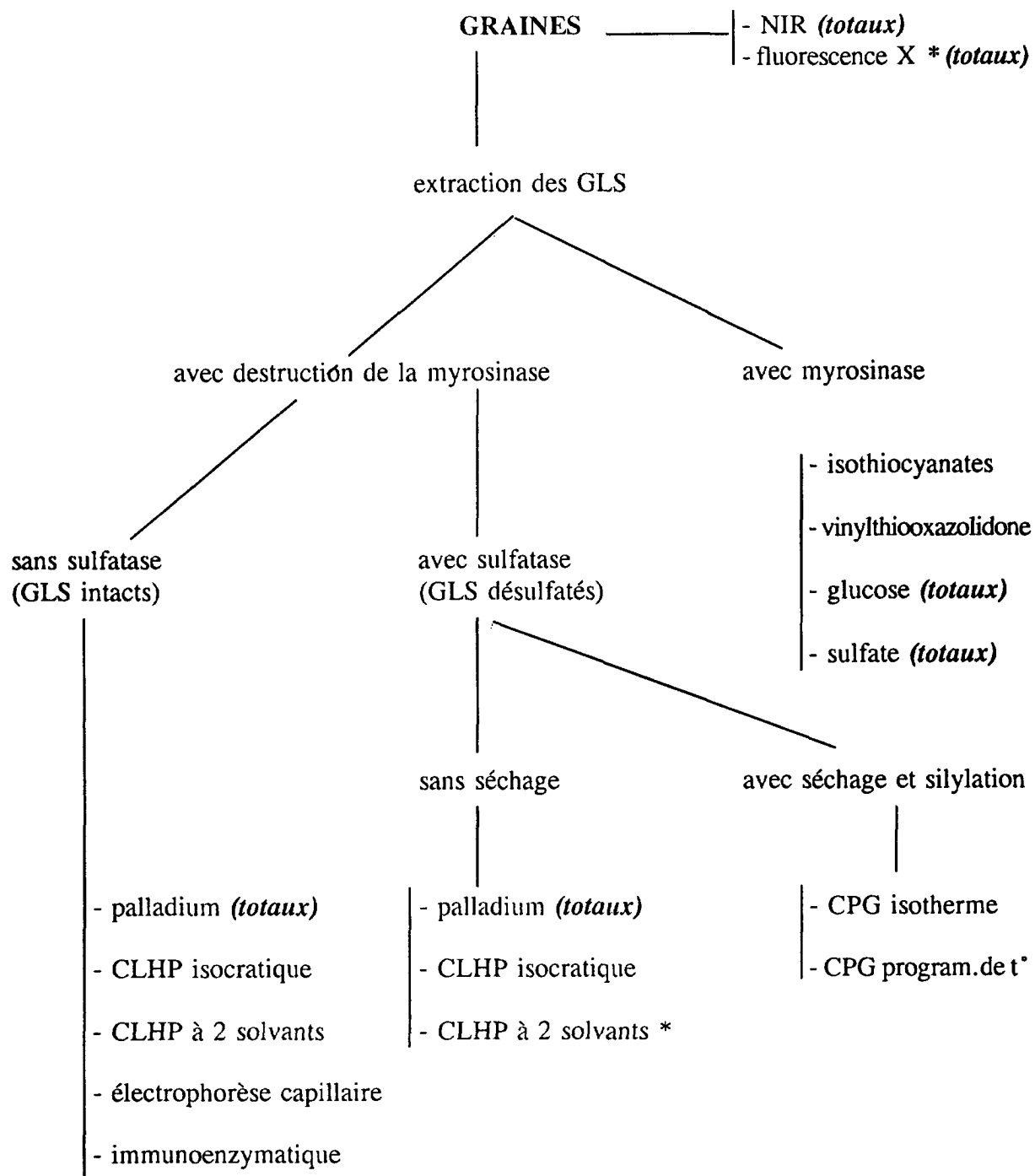
L'usage des matériaux de référence est à recommander car il permet d'améliorer la reproductibilité des résultats.

TABLEAU 1: Formule des principaux glucosinolates des graines de colza



NOM	NOM DU RADICAL	NATURE DU RADICAL
gluconapine (GNA)	but-3-enyl	aliphatique
glucobrassicinapine (GBN)	pent-4-enyl	"
progoitrine (PRO)	2R-hydroxy-3-enyl	"
épi-progoitrine (EPRO)	2S- hydroxy-3-enyl	"
gluconapoléiférine (GNL)	2-hydroxy-4 -enyl	"
sinalbine (SNB)	p-hydroxybenzyl	aromatique
gluconasturtine (GST)	phénéthyl	"
4 OH glucobrassicine (4-OHGBS)	4-hydroxyindol-3-ylméthyl	indol
néoglucobrassicine (NGBS)	N-methoxyindol-3-ylmethyl	"
glucobrassicine (GBS)	indol-3-ylmethyl	"
glucoalysine (GAL)	5-méthylsulfinylpentyl	soufré

TABLEAU 2 : Principales méthodes de dosage des glucosinolates (GLS) totaux, des glucosinolates intacts ou désulfatés.



* méthode officielle de la CEE et/ou projet de méthode ISO

TABLEAU 3 : Analyses circulaires organisées par l'ISO depuis 1984 dans le cadre de du dosage des glucosinolates

1984	sur graines (2 échantillons) et tourteau (1 échantillon)		
	- CPG sans programmation de t°	11	laboratoires
	- CPG avec programmation de t°	2	"
	- CLHP (désulfoglucosinolates)	2	"
1986	sur graines (3 échantillons)		
	- CPG avec programmation de t°	12	"
	- glucose	9	"
	- palladium	11	"
	- CLHP (désulfoglucosinolates)	6+4	"
1988	sur graines (4 échantillons)		
	- CLHP (désulfoglucosinolates)	11	"
	- glucose avec purification sur colonne	12	"
	- thymol	5	"
	- fluorescence aux rayons X	10	"
	- NIR	4	"
1990	sur graines (3 échantillons)		
	- CLHP (désulfoglucosinolates)	12	"
	- fluorescence aux rayons X (avec standards)	20	"
1992	sur tourteaux (3 échantillons)		
	- CLHP (désulfoglucosinolates)	12	"

CLHP : Chromatographie liquide à haute performance

CPG : Chromatographie en phase gazeuse

TABLEAU 4 : Comparaison entre différentes méthodes de dosage des glucosinolates dans les graines.
 Coefficient de variation de répétibilité des résultats () = moyenne en $\mu\text{mole/g}$

Année	1986			1988			1990		
ECHANTILLON	A	B	C	B	A	D	C	A	B
CPG avec programmation de t°	5.6 (16.5)	2.5 (36.6)	2.5 (92.8)						
HPLC (sinigrine) (glucotropaeoline)				4.4 (14.1)	8.5 (20.6)	3.3 (25.6)	4.6 (13.7) 7.3 (12.9)	4.1 (19.3) 5.9 (18.2)	2.7 (35.2) 6.5 (33.9)
Fluorescence rayons X				2.8 (21.9)	5.0 (22.7)	3.4 (26.6)	2.6 (11.8)	2.8 (16.0)	1.9 (32.4)
glucose	4.5 (32.1)	4.3 (50.5)	3.3 (91.0)	10.0 (11.6)	6.5 (19.0)	9.7 (22.3)			
palladium	7.8 (21.1)	10.2 (36.2)	4.3 (86.7)						
Thymol				6.9 (14.0)	6.9 (20.6)	11.0 (23.0)			

TABLEAU 5 : Comparaison entre différentes méthodes de dosage des glucosinolates dans les graines.
 Coefficient de variation de reproductibilité des résultats () = moyenne en $\mu\text{mole/g}$

Année	1986			1988			1990			
	A	B	C	B	A	D	C	A	B	
CPG avec programmation de t°	22.0 (16.5)	19.5 (36.6)	12.0 (92.8)							
HPLC (sinigrine) (glucotropaeoline)				18.0 (14.1)	17.0 (20.6)	9.4 (25.6)	12.0 (13.7) 13.0 (12.9)	10.2 (19.3) 12.3 (18.2)	11.6 (35.2) 13.7 (33.9)	
Fluorescence rayons X				21.0 (21.9)	19.0 (22.7)	14.0 (26.6)	5.8 (11.8)	7.4 (16.0)	5.6 (32.4)	
glucose	54.0 (32.1)	36.0 (50.5)	30.0 (91.0)	45.0 (11.2)	21.0 (19.0)	25.0 (22.3)				
palladium	22.0 (21.1)	21.0 (36.2)	22.0 (86.7)							
Thymol				34.0 (14.0)	30.0 (20.6)	36.0 (23.0)				

TABEAU 6 : Dosage des glucosinolates dans les tourteaux de colza
 Résultats de l'analyse circulaire ISO 1992
 Nombre de laboratoires : 11 Nombre de répétitions : 2

Echantillon	A	A	A	A	A	B	B	B	B	B	C	C	C	C	C
	TOT	PRO	GNA	4 OH	GBN	TOT	PRO	GNA	4 OH	GBN	TOT	PRO	GNA	4 OH	GBN
Moyenne générale	13.4	7.8	2.7	0.9	0.8	47.5	27.4	12.3	2.2	2.6	5.9	2.6	1.4	0.4	0.4
Ecart type (répétabilité)	0.41	0.31	0.10	0.08	0.03	1.39	1.18	0.83	0.21	0.16	0.21	0.12	0.07	0.03	0.02
Coef. de variation (répétabilité)	3.09	3.94	3.67	9.27	3.66	2.92	4.31	6.78	9.22	6.21	3.61	4.56	5.39	8.88	6.75
Répétabilité	1.16	0.86	0.28	0.23	0.09	3.89	3.30	2.33	0.58	0.46	0.60	0.33	0.21	0.09	0.07
Ecart type (reproductibilité)	1.11	0.73	0.33	0.28	0.15	3.71	2.48	1.80	1.19	0.47	0.86	0.29	0.25	0.15	0.18
Coef. de variation (reproductibilité)	8.33	9.38	12.27	31.85	17.82	7.81	9.06	14.67	53.31	17.83	14.44	11.37	18.02	42.05	48.73
Reproductibilité	3.11	2.04	0.92	0.78	0.42	10.39	6.94	5.05	3.33	1.31	2.40	0.81	0.69	0.43	0.49

TABLEAU 7 : Matériaux de référence préparés par le BCR (CCE)

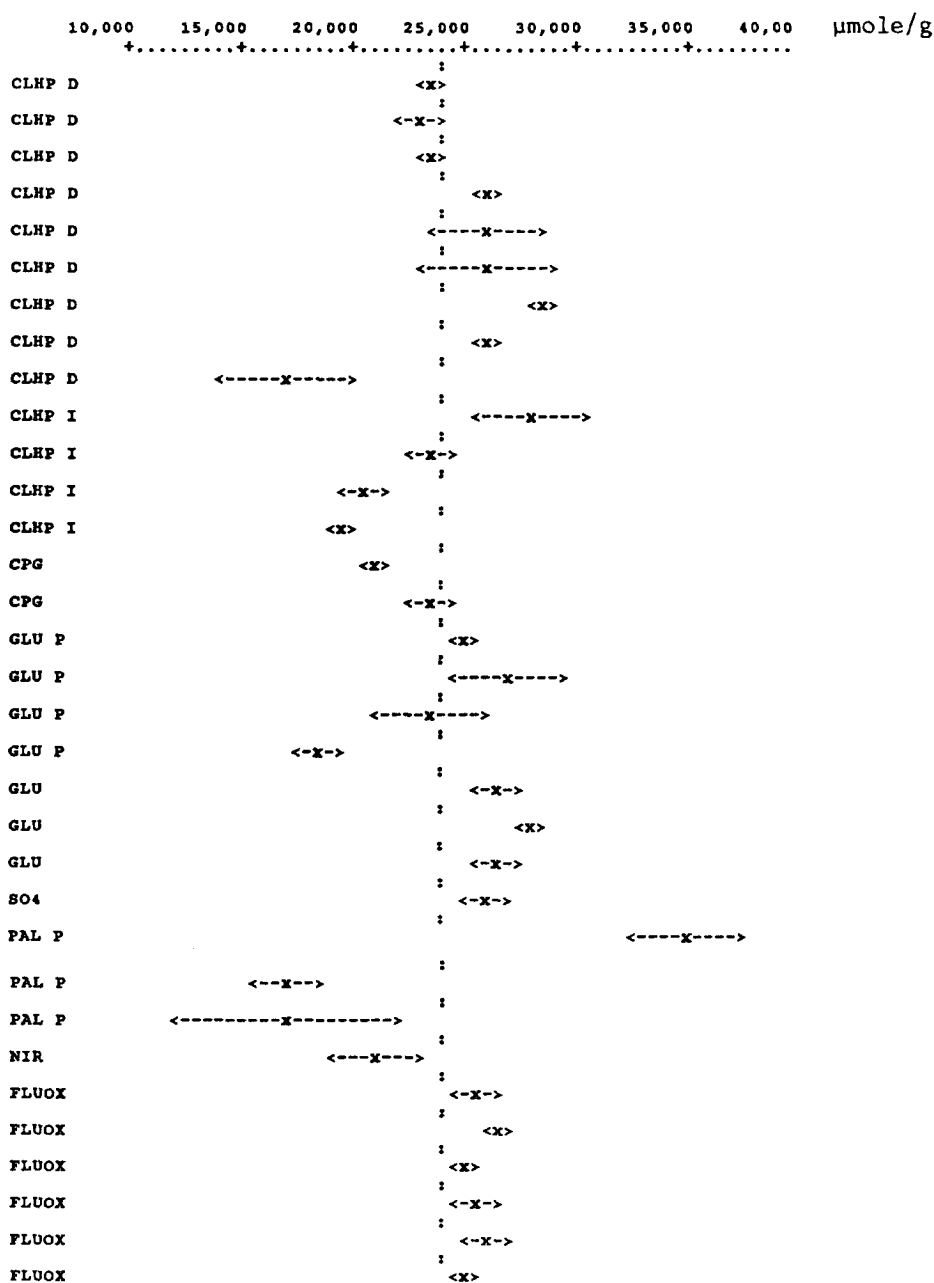
A Teneurs certifiées en glucosinolates totaux ($\mu\text{mole/g}$)

RM	Moyenne (intervalle de confiance 95%)	écart type	nombre de résultats acceptés
RM 366	12.1	+/- 0.8	18
RM 190	25.5	+/- 0.9	16
RM 367	102.0	+/- 3.0	16

B Teneurs certifiées en soufre total (mg/g)

RM	Moyenne (intervalle de confiance 95% l)	écart-type	nombre de résultats acceptés
RM 366	3.41	+/- 0.12	4
RM 190	4.93	+/- 0.15	4
RM 367	10.5	+/- 0.40	4

FIGURE 1 : Résultats de la première intercomparaison organisée par le BCR
 Dosage des glucosinolates (graines de la variété DARMOR)



Légende: CLHP : chromatographie liquide à haute performance (D : GLS désulfatés, I: GLS intacts)
 CPG : chromatographie en phase gazeuse
 GLU : méthode au glucose (P: avec purification sur colonne)
 SO4 : dosage des sulfates
 PAL : méthode au palladium (P: avec purification sur colonne)
 NIR : réflectance and le proche infrarouge
 FLUOX: fluorescence aux rayons X