

Différentes méthodes de dosage des glucosinolates

Quelques résultats comparatifs

D. RIBAILLIER et A. QUINSAC

CETIOM - Laboratoire d'Analyses - 45160 ARDON (France)

Introduction :

Disposer d'une méthode de dosage des glucosinolates fiable est une préoccupation importante d'un grand nombre de personnes :

- les sélectionneurs qui recherchent une méthode rapide, car ils doivent réaliser un nombre très important de déterminations, utilisant si possible de faibles quantités de graines.

- les agriculteurs et les organismes stockeurs qui souhaitent disposer à la récolte d'une technique rapide, fiable et peu coûteuse, leur permettant de pouvoir rapidement trier les graines "O" ou "OO" de façon à bénéficier de la prime versée par la C.C.E.

- les industriels huiliers désirant avoir une fiabilité maximum au niveau du résultat.

- les fabricants d'aliments des animaux qui avant d'acheter un tourteau veulent s'assurer d'une façon certaine de sa qualité et connaître en particulier la teneur des différents glucosinolates.

Quelles techniques s'offrent à ces utilisateurs potentiels ?

Les différentes méthodes de dosage des glucosinolates

On peut les classer en deux grands groupes :

- dosage global des glucosinolates
- détermination individuelle de chaque glucosinolate dont la somme donnera la teneur globale de l'échantillon

1/ Dosage global des glucosinolates

Il faut à ce niveau différencier deux groupes :

- les méthodes directes, qui dosent directement les glucosinolates ou l'un de leur produit de dégradation
- les méthodes indirectes qui nécessitent l'étalonnage préalable d'un appareil, étalonnage réalisé en utilisant des échantillons analysés préalablement par voie directe chimique.

1.1/ Méthodes directes

Dosage des ITC et de la VTO

C'est une ancienne méthode mise au point par Young et Wetter (1) elle est maintenant quasiment abandonnée, car elle ne dosait qu'une partie des glucosinolates et était longue à mettre en oeuvre.

Dosage du glucose

Cette technique dont l'un des précurseur fut Lein (2), trouve actuellement deux applications pratiques :

- le test du marteau et ses dérivés (3-4) qui permet avec une bandelette réactive, une estimation rapide (< 5 min.) du glucose libéré, lors de l'écrasement de quelques graines. La précision est faible mais le coût de la détermination est modique. C'est actuellement l'une des méthodes utilisées à grande échelle en France, pour le tri des lots de graines à la réception chez les organismes stockeurs.

Fiebig et Kallweit (5) utilisent pour la mesure un mini-photomètre de poche déjà utilisé précédemment par Thies (6). Ceci augmente considérablement la durée de la mesure.

- le dosage enzymatique qui peut être réalisé, soit sur extraits bruts (7-8) en une vingtaine de minutes, soit sur des extraits purifiés (9) sur colonnes échangeuses d'ions, ce qui augmente assez notablement la durée de l'analyse, mais aussi la précision, mais diminue la variabilité des résultats.

Dosage des sulfates

La mesure des ions sulfates à été développée par Fiebig soit sous forme d'un test rapide mais peu précis (10), soit par chromatographie ionique (11), méthode performante qui permet de doser les glucosinolates totaux, même si ceux-ci ont été dégradés.

1.2/ Méthodes indirectes

Dosage du soufre

Schnug (12) a développé une méthode qui détermine indirectement les glucosinolates par dosage du soufre. Elle utilise un appareil de fluorescence X, la méthode est rapide, précise, mais l'investissement matériel est élevé. Cependant cette technique reconnue par la CCE, trouve actuellement un développement important en raison des rendements élevés possibles (150 analyses/jour).

Cette méthode requiert un étalonnage préalable avec des échantillons dont la teneur en glucosinolates a été déterminée par voie chimique.

Dosage du complexe Palladium - glucosinolates

La détermination consiste à mesurer l'absorption du complexe formé par les glucosinolates et le chlorure de palladium (13,14). Il est nécessaire de procéder à un étalonnage préalable.

Détermination des glucosinolates avec le réactif au thymol

Cette méthode a été mise au point par Brzezinski (15), elle consiste en une mesure spectrophotométrique de complexe coloré formé entre les glucosinolates et le réactif au thymol. C'est une mesure de routine (durée environ une heure).

Spectrométrie de réflectance dans le proche infra-rouge

Cette technique qui se développe rapidement dans le domaine agroalimentaire, permet de procéder à une détermination rapide des glucosinolates (16-17) à condition que l'appareil ait été préalablement étalonné avec une gamme d'échantillons témoins analysés chimiquement. L'avantage majeur de cette méthode réside dans le fait que les déterminations peuvent s'effectuer directement sur graines entières et qu'en plus des glucosinolates les autres composants de la graine (humidité, huile, protéines...) peuvent être déterminés simultanément (18).

2/ Dosage des glucosinolates individuels

2 méthodes sont utilisables pour déterminer individuellement les glucosinolates.

La chromatographie en phase gazeuse avec programmation de température (CPG)

C'est la méthode officielle de la CCE. Les glucosinolates sont analysés après désulfatation et silylation (19).

La chromatographie liquide hautes performances (CLHP) qui permet d'analyser les glucosinolates sous forme intacte (20) ou sous forme désulfatée (19). Cette dernière technique pourrait devenir dans les prochains mois la méthode communautaire. Elle offre l'avantage d'être plus fiable, ou quantitativement et qualitativement, surtout envers les indolglucosinolates et d'être facilement automatisable.

III RESULTATS

Un certain nombre de résultats d'essais comparant ces différentes méthodes ont été publiés.

Wathelet et Col. (9) ont comparé sur 96 échantillons par rapport à la CLHP, les méthodes au glucose, au palladium, et CPG (Tableau 1)

TABLEAU 1 : Etudes comparatives de 4 méthodes de dosage des glucosinolates selon Wathelet (9)

	r	SE	biais
Méthode au glucose - HPLC	0,995	2,286	+0,055
Méthode au palladium - HPLC	0,990	3,418	+6,763
CPG - HPLC	0,995	2,950	-2,482
Palladium - glucose	0,994	2,729	+6,708

Les auteurs concluent que :

- la méthode au palladium est très accessible et peu coûteuse, mais qu'elle donne des valeurs généralement trop élevées par rapport à la CLHP

- la CPG donne des valeurs sous estimées car elle ne dose pas tous les glucosinolates

- la méthode au glucose avec purification des extraits fournit des résultats concordant avec l'HPLC

Schnug et Kalweit (21) rapportent les résultats d'une analyse circulaire réalisée en RFA sur 24 échantillons de graines analysés dans 3 laboratoires comparant la CLHP et la fluorescence X (Tableau 2).

TABLEAU 2 : Comparaison CLHP - Fluorescence X

Valeur moyenne des résultats CLHP ($\mu\text{mol/g}$)	40,2
Valeur moyenne des résultats Fluo X ($\mu\text{mol/g}$)	39,7
Ecart type de répétabilité (Fluo X) ($\mu\text{mol/g}$)	1,6
Ecart type de reproductibilité ($\mu\text{mol/g}$)	4,5
Corrélation fluorescence X - CLHP	0,98

Nous avons organisé récemment dans le cadre de l'ISO une analyse circulaire internationale regroupant 32 laboratoires de 10 pays. Elle comportait 4 échantillons (A : Tobin, B : Westar, C : Brassica campestris, D : Darmor) dont les teneurs en glucosinolates s'échelonnaient de 5 à 25 $\mu\text{mol/g}$

5 méthodes ont été mises en oeuvre par les différents laboratoires :

- chromatographie liquide haute performance (Tableau 3)
- dosage enzymatique du glucose (Tableau 4)
- méthode au thymol (Tableau 5)
- fluorescence X (Tableau 6)

IV DISCUSSION DES RESULTATS

Les résultats moyens obtenus par les différentes méthodes sont regroupés dans le tableau 7. On remarquera que les graines analysées étaient de qualité "00" (B et C) ou proches (A et D) (norme à 20 $\mu\text{mol/g}$).

On peut conclure :

- que d'une manière globale les résultats obtenus par les différentes méthodes sont très proches. Cependant il faut noter 2 résultats aberrants, l'un par fluorescence X sur l'échantillon B (Westar), l'autre par la méthode au thymol sur l'échantillon C (Brassica campestris). Nous n'avons pas d'explication de ces anomalies.

- la CLHP et la fluorescence X donnent les valeurs les plus faibles au niveau des écarts type de répétabilité,

- en ce qui concerne la reproductibilité, c'est la méthode CLHP qui donne les meilleurs résultats devant la fluorescence X. La méthode au glucose pose problème pour les faibles valeurs.

Tableau 3: Dosage des glucosinolates par chromatographie liquide hautes performances

	COLZA A	COLZA B	COLZA C	COLZA D
Nombre de laboratoires retenus après élimination des aberrants	11	11	11	11
Moyenne	20,6	14,1	4,9	25,6
Ecart-type de répétabilité	1,7	0,6	0,3	0,8
Coefficient de variation de répétabilité	8,5 %	4,4 %	6,7 %	3,3 %
Répétabilité	4,9	1,7	0,9	2,4
Ecart-type de reproductibilité	3,4	2,5	1,5	2,4
Coefficient de variation de reproductibilité	17 %	18 %	31 %	9,4 %
Reproductibilité	9,6	7,1	1,4	6,8

Tableau 4: Dosage des glucosinolates par dosage enzymatique du glucose

	COLZA A	COLZA B	COLZA C	COLZA D
Nombre de laboratoires retenus après élimination des aberrants	12	12	11	12
Moyenne	19,0	11,6	4,4	22,3
Ecart-type de répétabilité	1,2	1,2	1,2	2,2
Coefficient de variation de répétabilité	6,5 %	10 %	28 %	9,7 %
Répétabilité	3,5	3,5	3,4	6,1
Ecart-type de reproductibilité	4,0	5,2	3,6	5,6
Coefficient de variation de reproductibilité	21 %	45 %	82 %	25 %
Reproductibilité	11,3	14,7	10,2	15,8

Tableau 5: Dosage des glucosinolates par le réactif au thymol

	COLZA A	COLZA B	COLZA C	COLZA D
Nombre de laboratoires retenus après élimination des aberrants	5	4	5	5
Moyenne	20,6	14,0	10,2	23,0
Ecart-type de répétabilité	1,4	1,0	0,7	2,5
Coefficient de variation de répétabilité	6,9 %	6,9 %	6,6 %	11 %
Répétabilité	4,0	2,7	1,9	7,03
Ecart-type de reproductibilité	6,1	4,7	5,1	8,2
Coefficient de variation de reproductibilité	30 %	34 %	50 %	36 %
Reproductibilité	17,3	13,4	14,4	23,2

Tableau 6: Détermination des glucosinolates par fluorescence X

	COLZA A	COLZA B	COLZA C	COLZA D
Nombre de laboratoires retenus après élimination des aberrants	10	10	7	10
Moyenne	22,7	21,9	4,7	26,6
Ecart-type de répétabilité	1,1	0,6	0,9	0,9
Coefficient de variation de répétabilité	5 %	2,8 %	20 %	3,4 %
Répétabilité	3,2	1,7	2,7	2,6
Ecart-type de reproductibilité	4,2	4,7	2,1	3,8
Coefficient de variation de reproductibilité	19 %	21 %	44 %	14 %
Reproductibilité	12	13,3	5,8	10,7

Tableau 7: Résumé des résultats obtenus par les différentes méthodes

METHODES	ECHANTILLON			
	D	A	B	C
HPLC	25,6	20,6	14,1	4,9
Glucose	22,3	19,0	11,6	4,4
Thymol	23,0	20,6	14,0	<u>10,2</u>
Rayons X	26,6	22,7	<u>21,9</u>	4,7

V CONCLUSION

Les différents résultats montrent que le chimiste dispose actuellement d'un arsenal très complet de méthodes de dosage des glucosinolates depuis des tests très rapides mais peu précis jusqu'à des méthodes très fiables mais beaucoup plus longues à mettre en oeuvre.

Le choix semble cependant fait aussi bien au niveau européen (CCE) qu'international (ISO) pour retenir

- une méthode de référence dosant individuellement tous les glucosinolates avec précision : la chromatographie liquide haute performance (CLHP) des glucosinolates désulfatés

- une méthode rapide, fiable, mais indirecte donnant une valeur globale de la teneur en glucosinolates : la spectrométrie de fluorescence X

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

BIBLIOGRAPHIE

- 1 - C.G. Youngs, L.R. Wetter - J.A.O.C.S., 44, 551, 1967
- 2 - K.A. Lein, Z. Pflanzenzüchtung - 63, 137 (1970)
- 3 - D. Ribaillier et A. Quinsac - Bulletin CETIOM, n° 97, 11, 1988
- 4 - Laboratoires Wolff - Le Nouvel Agriculteur du 24.03.89, p. 36
- 5 - H.J. Fiebig und P. Kallweit - Fett Wissenschaft Technologie. Fat Science Technology, 89, 135, (1987)
- 6 - W. Thies, Fette Seifen Anstrichmittel - 87, 347 (1985)
- 7 - L. Rugraff, S. Chemin Douaud et A. Karleskind - Revue Française des Corps Gras, 33, 207, (1986)
- 8 - C. Gardrat et A. Prévot - Revue Française des Corps Gras, 34, 457, (1987)
- 9 - J. P. Wathelet, M. Cwikowski, M. Marlier et M. Severin - Revue Française des Corps Gras, 35, 177, (1988)
- 10 - H.J. Fiebig - Raps, n° 1, 43, (1988)
- 11 - V.A. Sendfeld, H.J. Fiebig und K. Aitzetmüller - Fat. Sci. Technol., 90, 83, 1988
- 12 - E. Schnug und S. Haneklaus - Raps n°4, 128, (1986)
- 13 - W. Thies, Fette Seifen Anstrichmittel - 84, 338, (1982)
- 14 - P. Möller, A. Plöger und H. Sorensen, Martinus Nijhoff/Dr W. Junk Publishers, 97, (1985)
- 15 - W. Brzezinski and P. Mendelewski - Pflanzenzucht, 93, 177, (1984)
- 16 - M. Lila et V. Furstoss, Agronomie, 6, 703, (1986)
- 17 - M. Renard, C. Bernard, M. Deschamps, V. Furstoss, M. Lila, A. Quinsac, J.M. Régner, D. Ribaillier - Proceedings 7ème Congrès Colza, Poznan, 11-14 Mai 1987 (sous presse)
- 18 - D. Ribaillier, L. Chesneau, P. Bioteau - Proceedings of Euro Food Chem IV, Loen, Norway 1-4 juin 1987
- 19 - R.K. Heaney, E. Spinks, A. Hanley and G.R. Fenwick, Technical Bulletin ; Analysis of glucosinolates in rapeseed, FRI, Norwich (1986)
- 20 - P. Möller, O. Olsen, A. Plöger, K.W. Rasmussen and H. Sørensen - Advances in the production and utilization of cruciferous crops ; M. Nijhoff, p. 111, (1984)
- 21 - E. Schnug und P. Kallweit - Fat. Sci. Technol. 89, 377, 1987